Aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Nuklearmedizinische Abteilung
(Leiter: Professor Dr. med. Karl Oeff)

METHODIK UND KLINISCHE ANWENDUNG DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG VON SCHILDDRÜSEN-STIMULIERENDEM-HORMON (TSH)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Bogner
Salzgitter-Lebenstedt

1974

Aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Nuklearmedizinische Abteilung
(Leiter: Professor Dr. med. Karl Oeff)

METHODIK UND KLINISCHE ANWENDUNG DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG VON SCHILDDRÜSEN-STIMULIERENDEM-HORMON (TSH)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Bogner
Salzgitter-Lebenstedt

Referent: Professor Dr. med. Karl Oeff

Korreferent: Professor Dr. med. P. Freyschmidt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 28.8.1974

UNIV. LEIDEN BIBL.

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. Physiologie und Regulation des TSH

1.2. Grundlagen der radioimmunologischen Hormonbestimmung

2. METHODIK

2.1. Materialien

2.2. Experimentelle Durchführung

2.2.1. Markierung

2.2.2. Ansatz und Durchführung der radioimmunologischen Bestimmung

2.2.3. Radioaktivitätsmessung

2.2.4. Qualitätskontrolle

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Ergebnisse zu methodischen Untersuchungen

3.1.1. Markierung

3.1.2. Antikörpertitration

3.1.3. Standardkurve

3.1.4. Kreuzreaktion mit HCG

3.1.5. Trennung von freiem und antikörpergebundenem TSH

3.1.6. Präzision, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Wiederfindung des Verfahrens

3.2. Klinische Anwendung

3.2.1. Normalwerte

3.2.2. TSH-Anstieg nach Unterbrechung der Schilddrüsenhormonsubstitution

3.2.3. Substitution mit L-Thyroxin

3.2.4. Schlußfolgerungen

4. ZUSAMMENFASSUNG

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. Physiologie und Regulation des TSH

Das Thyreoidea-Stimulierende-Hormon (TSH), in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) gebildet, ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 25000-28000. Das Molekül besteht aus zwei Untereinheiten, der α- und der ß-Kette. Die Struktur und die Aminosäuresequenz der α-Kette ist annähernd identisch mit der des luteotropen Hormons (LH), das ebenfalls im HVL gebildet wird, und der des in der Plazenta produzierten Human-Chorion-Gonadotropins (HCG)(1).

Die Funktion des TSH beruht auf seiner stimulierenden Wirkung auf die Schilddrüse. TSH führt innerhalb weniger Minuten nach seiner Applikation zu einer Mobilisierung und Ausschüttung der Schilddrüsenhormone Thyroxin (Tetrajodthyronin, T_4) und Trijodthyronin (T_3)(2). Der Mechanismus wird auf eine Erhöhung der Proteolyse des Thyreoglobulins, an das die Hormone in der Schilddrüse gekoppelt sind, zurückgeführt (3). Andererseits stimuliert TSH wahrscheinlich auch die Bildung des Thyreoglobulins, eines Glykoproteids, in dem die T_3- und T_4-Synthese erfolgt (4). Ferner wird nach der TSH-Applikation eine vermehrte Jodaufnahme festgestellt (5,6), die ihr Maximum nach 15-24 Stunden erreicht. Auf lange Sicht wird die Vaskularisation der Drüse, ihre Hyperplasie und Hypertrophie gefördert, während Kolloid- und Jodgehalt abnehmen.

Diese verschiedenartigen Wirkungen des TSH beruhen nicht auf voneinander unabhängigen Reaktionen, sondern sind auf eine begrenzte Anzahl von Grundreaktionen im Schilddrüsenstoffwechsel zurückzuführen. So steigern TSH-Gaben in der Schilddrüse die Glucoseoxidation (7,8), die Phospholipidsynthese (9), die Ribonucleinsäure- und Proteinsynthese (6,10) und die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat(11).

Die TSH-Sekretion unterliegt einem Regelmechanismus, der einen den jeweiligen Bedürfnissen angepaßten Hormonspiegel gewährleistet. Der Regelkreis besteht aus drei Hauptkomponenten (Abb.1): dem Hypothalamus, dem Hypophysenvorderlappen und der Schilddrüse und ihren entsprechenden Substraten wie dem TRH, TSH und den Schilddrüsenhormonen. Zwischen HVL und Schilddrüse besteht

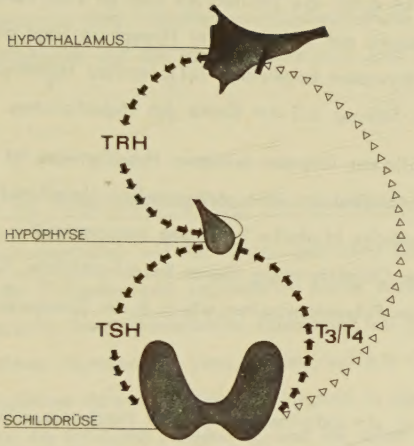


Abb.1: Schematische Darstellung der Regulation der Schilddrüsenfunktion

bedingt durch das TSH eine direkte Proportionalität, d.h. eine vermehrte TSH-Ausschüttung induziert eine vermehrte T_3/T_4-Sekretion. Ein negatives Rückkopplungssystem garantiert die Einhaltung physiologischer Hormonspiegel (12). So bremst ein Überschuß an Schilddrüsenhormonen in der Peripherie die Ausschüttung von TSH, während ein Mangel die TSH-Abgabe stimuliert. Die Hypophyse wiederum ist einem übergeordneten Zentrum im Hypothalamus unterstellt, das durch das Thyreotropin-Releasing-Hormone (TRH) die TSH-Freisetzung induziert (13, 14). Die Aufklärung der Struktur und die Synthese dieses Releasing-Hormons ist kürzlich erfolgt. Es handelt sich um ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutamin, Histidin und Prolin (15, 16). Seine Wirkung auf den Hypophysenvorderlappen beruht einmal in einer vermehrten Freisetzung von gespeichertem TSH (17) und zum anderen in der Anregung zur TSH-Synthese (18). Ebenso wie das TSH wird auch die TRH-Ausschüttung durch erhöhte Schilddrüsenhormonspiegel

blockiert (19). Zusätzlich sollen bisher hypothetische Schaltungen zwischen dem Hypothalamus und weiteren Gehirnzentren vorhanden sein (20).

Krankheiten, deren Ursache durch die Schilddrüse bedingt sind, werden als primäre, solche, deren Ursache auf der Stufe der Hypophyse liegt, als sekundäre Hypo- bzw. Hyperthyreosen bezeichnet (21). Tertiäre Hypothyreosen (22-24) sind Folge einer Störung auf der Ebene des Hypothalamus.

Speziell das Krankheitsbild der latenten primären Hypothyreose ist von Interesse. Es handelt sich hierbei um eine geringgradige Unterfunktion der Schilddrüse, die kaum typische klinische Symptome verursacht. Erst neuere Testverfahren führten zur Objektivierung dieses Krankheitsbildes. Seine Beziehung zu eventuellen Folgekrankheiten, wie z.B. der Koronarsklerose, wird erörtert (25-27).

In den letzten Jahren ist ein radioimmunologisches Nachweisverfahren für TSH entwickelt worden, das eine quantitative Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Blut ermöglicht (28, 29). Es kann damit wesentlich zur Diagnosestellung der oben erwähnten und anderer das System Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse betreffender Fragestellungen beitragen. Da dieses analytische Verfahren bisher noch nicht standardisiert ist und - wie später ersichtlich - gewisse technische Schwierigkeiten beinhaltet, war es die Hauptthematik dieser Dissertation, die methodische Durchführung und Weiterentwicklung des Radioimmunoassays (RIA) für TSH zu erstellen, so daß er zur Routinediagnostik eingesetzt werden konnte.

Die medizinische Fragestellung, die sich der methodischen Durchführung anschloß, betraf einmal die Erstellung von TSH-Normalwerten im menschlichen Serum. Zum anderen sollte anhand der TSH-Werte beantwortet werden, wie lange Patienten, deren Schilddrüse aufgrund neoplastischer Veränderungen reseziert worden war, vor der Durchführung eines Radiojod-Szintigrammes von der Substitution mit T_3/T_4 abgesetzt werden müssen. Bislang wurde meist 6 Wochen vor der Durchführung dieses Testes die Schilddrüsenhormonsubstitution gestoppt. Da die Patienten in dieser Zeit stark hypothyreot werden und unter diesem Zustand äußerst leiden, sollte experimentell geprüft werden, ob man diese Phase

verkürzen kann und inwieweit dies von der Art der vorherigen Substitution abhängig ist. Die Resubstitution der Patienten wurde unter fortlaufender Kontrolle der TSH-Spiegel durchgeführt. Vergleiche mit anderen schilddrüsenspezifischen Parametern wie dem Trijodthyronin-Bindungs-Index (TBI), der Bestimmung des Gesamtthyroxins und des proteingebundenen Jods (PBJ) wurden angestellt.

1.2. Grundlagen der radioimmunologischen Hormonbestimmung

Geringe Serumkonzentrationen und das Fehlen spezieller funktioneller Gruppen im Molekül der Proteohormone verhinderten bisher deren direkte chemische Bestimmung. Biologische Nachweisverfahren (Bioassays), bei denen die biologische Wirkung dieser Hormone auf Versuchstiere, isolierte Organe oder Zellkulturen als analytischer Parameter benutzt wird, sind in den meisten Fällen zu zeitraubend für die klinische Anwendung und vor allem in ihrer Spezifität und Empfindlichkeit unbefriedigend (30-32). Erst seit der Einführung der radioimmunologischen Bestimmungsmethode, die erstmals von YALOW und BERSON (33) zum quantitativen Nachweis des Insulins entwickelt wurde, können befriedigende Ergebnisse auch mit anderen Proteohormonen erzielt werden.

Das Prinzip radioimmunologischer Bestimmungsmethoden beruht auf der Konkurrenz radioaktiv markierter (AG^*) und unmarkierter Antigene (AG) um ihren spezifischen Antikörper (AK).

$$\text{Antigen}^* + \text{Antikörper} \rightleftharpoons \text{Antigen}^*\text{—Antikörper}$$

$$+$$

$$\text{Antigen}$$

$$\Downarrow\Uparrow$$

$$\text{Antigen-Antikörper}$$

Markiertes und unmarkiertes Antigen reagieren reversibel mit dem Antikörper unter Bildung eines AG-AK-Komplexes.

$$AG + AG^* + AK \rightleftharpoons AG\text{-}AK + AG^*\text{-}AK + AG + AG^* + AK$$

Diese Reaktion unterliegt dem Massenwirkungsgesetz. Da die Konzentration des markierten Antigens und des Antikörpers konstant gehalten werden, nimmt die Radioaktivität des AG-AK-Komplexes in der gleichen Weise ab, wie die Konzentration des unmarkierten nachzuweisenden Hormons im Versuchsansatz zunimmt. Zur quantitativen Auswertung der Meßdaten ist die Erstellung einer Eichkurve (Standardkurve) erforderlich. Man erhält sie, indem man in den Inkubationsansatz steigende Mengen von unmarkiertem Hormon gibt. Mit Zunahme der Konzentration an unmarkiertem Hormon resultiert eine ständig fallende Bindung von markiertem Hormon am Antikörper und damit eine kontinuierliche Abnahme der antikörpergebundenen Aktivität. Wird in einem Diagramm das Verhältnis der antikörpergebundenen zur freien Aktivität in Beziehung zu den entsprechenden Konzentrationen unmarkierten Hormons gesetzt, so ergibt sich die Standardkurve.

Wie aus der Reaktionsgleichung ersichtlich, liegen im Inkubationsansatz das unmarkierte Antigen (AG), das radioaktiv markierte Antigen (AG^*), der AG-AK-Komplex und der AG^*-AK-Komplex nebeneinander vor. Es ist somit für die Gewinnung von Meßdaten unumgänglich, das ungebundene freie Antigen (AG und AG^*) vom antikörpergebundenen Antigen (AG-AK und AG^*-AK) zu trennen. Nach der Trennung läßt sich dann die Radioaktivität der Komponenten ermitteln. Zur Trennung sind elektrophoretische, chemische und immunologische Methoden entwickelt worden: u.a. die Chromatoelektrophorese (28, 33), die Salzfällung (29, 34), die Adsorption an Aktivkohle (35), Trennung durch Ionenaustauscher (36), Elektrophorese auf Cellulose-acetat Streifen (37) oder auf Polyacrylamidgel (38).

Als universell einsetzbares Verfahren zur Trennung der freien von der antikörpergebundenen Radioaktivität hat sich die von HALES und RANDLE (39) entwickelte Doppelantikörper-Methode durchgesetzt. Sie beruht auf der Präzipitation des löslichen Antigen-Antikörper-Komplexes durch einen zweiten Antikörper, der als Antigammaglobulin gegen den ersten, hormonspezifischen Antikörper gerichtet ist.

Zur Erzeugung hormonspezifischer Antikörper werden in den meisten Fällen Kaninchen verwendet. Der nach der Immunisierung im gewonnenen Antiserum

vorliegende erste Antikörper, der gegen das nachzuweisende Hormon gerichtet ist, stellt also ein Kaninchen-Gammaglobulin dar. Zur Gewinnung des 2. Antikörpers, der in der Lage ist, den ersten Antikörper, das Kaninchen-Gammaglobulin, auszufällen, werden andere Versuchstiere (Schaf, Esel) mit Kaninchen-Gammaglobulin immunisiert. Das hierdurch gewonnene sog. Präzipitationsserum enthält Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antikörper, die sämtliches Kaninchen-Gammaglobulin im Reaktionsansatz zur Präzipitation bringen.

Bei vielen radioimmunologischen Verfahren wird der hormonspezifische erste Antikörper in hoher Verdünnung eingesetzt. Um unter diesen Bedingungen bei Anwendung der Doppelantikörper-Methode eine deutliche Präzipitatbildung zu erreichen, erhöht man die Kaninchen-Gammaglobulinkonzentration im Reaktionsansatz durch Zusatz von normalem Kaninchenserum. Bei Inkubation mit dem Präzipitationsserum reagieren der erste Antikörper, an dem das radioaktiv markierte Hormon gebunden ist, und das zusätzlich eingebrachte Kaninchen-Gammaglobulin gemeinsam mit dem zweiten Antikörper. Es resultieren Proteinaggregate hohen Molekulargewichtes im Inkubationsansatz, die nach Zentrifugation der Proben zu einem sichtbaren und fest haftenden Niederschlag führen. Der Überstand, in dem sich die ungebundene Aktivität befindet, kann vom Präzipitat durch Abgießen oder Absaugen getrennt werden.

Die für einen quantitativen Hormonnachweis erforderliche Standardkurve läßt sich ermitteln, indem man für den gewünschten Konzentrationsbereich bekannte Mengen von unmarkiertem Hormon mit den übrigen Reaktanden inkubiert. Nach der Trennung des freien vom gebundenen Hormon und Messung entweder des freien oder antikörpergebundenen Radioaktivitätanteils können für die zeichnerische Darstellung der Standardkurve verschiedene Auftragungsarten gewählt werden. Während die zugegebene Menge unmarkierten Hormons im allgemeinen auf der x-Achse in einem linearen oder logarithmischen Maßstab abgetragen wird, ergeben sich für die Darstellung der antikörpergebundenen Aktivität auf der y-Achse mehrere Möglichkeiten. Bei Anwendung eines linearen Maßstabes auf der x-Achse:

1.) B/F B ("bound"): Zählrate des antikörpergebundenen markierten Hormons,

F ("free") : Zählrate des freien markierten Hormons, jeweils bei gegebener Konzentration von unmarkiertem Hormon.

2.) B_o/B B_o: Zählrate des antikörpergebundenen markierten Hormons bei Abwesenheit von unmarkiertem Hormon,

B : Zählrate des antikörpergebundenen markierten Hormons bei gegebener Konzentration von unmarkiertem Hormon.

Bei Benutzung eines logarithmischen Maßstabes auf der x-Achse ergeben sich als weitere Möglichkeiten der Auftragung auf der y-Achse:

3.) Zählrate des antikörpergebundenen markierten Hormons.

4.) B/T B : Zählrate des antikörpergebundenen markierten Hormons bei gegebener Konzentration von unmarkiertem Hormon,

T ("total") : Gesamtzählrate des markierten Hormons pro Ansatzröhrchen.

Bei Berechnung von B/T x 100 Angabe in Prozent möglich.

5.) B/B_o B : Zählrate des antikörpergebundenen markierten Hormons bei gegebener Konzentration von unmarkiertem Hormon,

B_o: Zählrate des antikörpergebundenen markierten Hormons bei Abwesenheit von unmarkiertem Hormon.

Bei Berechnung von B/B_o x 100 Angabe in Prozent möglich.

Bei logarithmischer Auftragung der Konzentrationen des unmarkierten Hormons

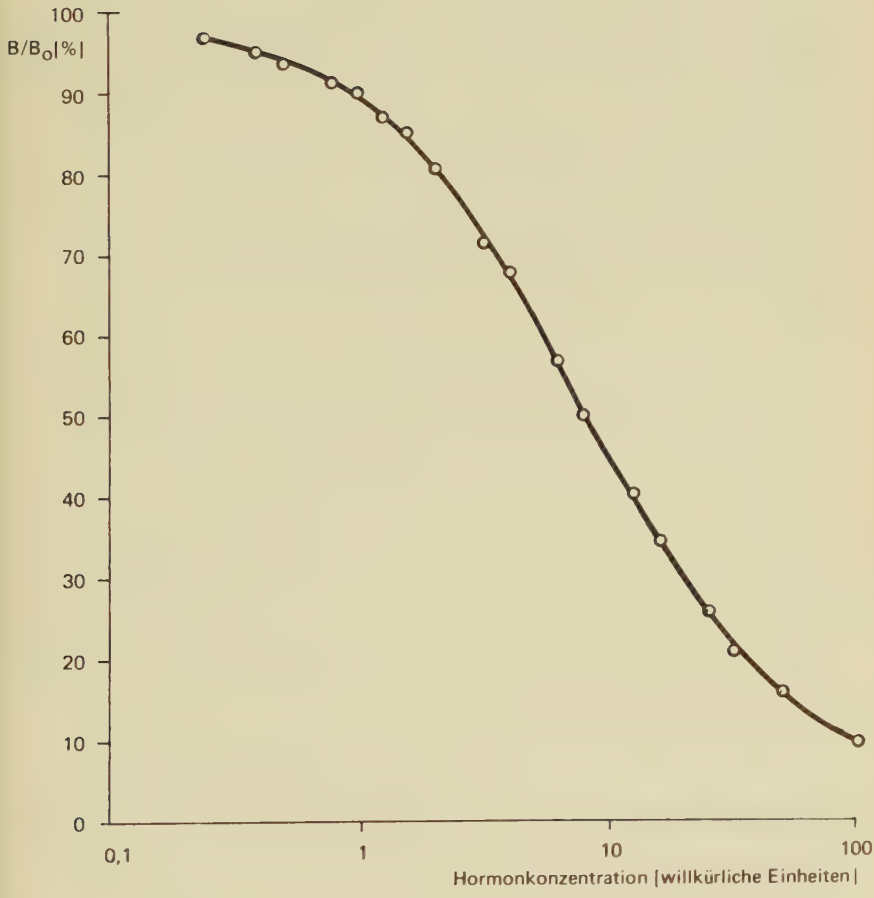


Abb.2: Allgemeine Form einer Standardkurve im halblogarithmischen System.

auf der x-Achse und linearer Auftragung von B/T oder B/B_o auf der y-Achse (Abb.2) verläuft die Standardkurve im mittleren Konzentrationsbereich als Gerade, wodurch sich bei der Ablesung der Kurvenpunkte gewisse Vorteile ergeben. Eine Linearisierung der Standardkurve über den gesamten Meßbereich läßt sich durch Auftragung der B/T bzw. B/B_o im Logit-System bei logarithmischer Auftragung der Konzentrationen von unmarkiertem Hormon auf der x-Achse erreichen. Die Logit-Transformation läßt sich bei prozentualer Angabe von B/B_o durchführen gemäß:

$$\text{Logit } B/B_o = \log_e \frac{B/B_o}{100 - B/B_o} = 2.303 \log_{10} \frac{B/B_o}{100 - B/B_o}$$

Eine totale Linearisierung der Standardkurve bietet Vorteile bei der Auswertung der Meßdaten mit Hilfe von elektronischen Rechenmaschinen. Weiterhin erlaubt sie bei graphischer Auswertung der Meßdaten eine leichte Bestimmung der Steilheit der Standardkurve, die unter anderem ein Kriterium für die Sensibilität des betreffenden Radioimmunoassay darstellt.

Nach Erstellen der Standardkurve können nun die Hormonkonzentrationen im Serum gemessen werden. Man gibt in den Ansatz statt bekannter Konzentrationen unmarkierten Hormons, wie es zur Darstellung der Standardkurve nötig war, Serumproben. Nach Beendigung der Inkubation ermittelt man die antikörpergebundene Aktivität und kann aus der Standardkurve die zugehörige Hormonkonzentration ablesen.

Als Voraussetzung für die praktische Durchführung einer radioimmunologischen Hormonbestimmung müssen die folgenden Materialien zur Verfügung stehen:

1. Hochgereinigtes Hormon,
2. spezifischer Antikörper gegen dieses Hormon,
3. radioaktiv markiertes Hormon,
4. geeignetes Inkubationsmedium für die Durchführung der radioimmunchemischen Reaktion,
5. Methode zur Trennung von antikörpergebundenem und freiem Hormon.

Seit der Einführung des ersten Radioimmunoassay für Insulin ist dieses Nachweisverfahren auch für andere Proteohormone entwickelt worden: so z.B. für das somatotrope Hormon (40), das adrenocorticotrope Hormon (41), das Human-Chorion-Gonadotropin (42), das luteinisierende Hormon (43), das Follikelstimulierende Hormon (44), das Vasopressin (45) und das Oxytocin (46), um nur einige zu nennen.

Erste radioimmunologische Bestimmungen des TSH wurden 1965 von ODELL, WILBER und PAUL (28) und UTIGER (29) parallel durchgeführt, nachdem die Reindarstellung des TSH aus Hypophysenextrakten (47) gelungen war. Die geringe Verfügbarkeit des Hormons, Verunreinigungen und eine geringe Stabilität erschweren dessen radioimmunologische Bestimmung.

2. METHODIK

2.1. Materialien

Hormone:

HTSH zur Markierung: Die Markierung erfolgte mit Präparationen des National Institute of Health (NIH), Bethesda, USA. Die Originallösung wurde mit 0.01 m Phosphatpuffer, pH 7.5, auf das Doppelte verdünnt und in 25 µl-Portionen (Konzentration 5 µg TSH/10 µl) bei -24°C eingefroren. Für die Markierungen wurden die Portionen kurzzeitig zur Entnahme der benötigten HTSH-Menge aufgetaut und sofort wieder eingefroren.

HTSH-Standard: HTSH-Standardpräparationen wurden vom National Institute for Medical Research (NIMR), London, England, zur Verfügung gestellt: Human Pituitary Thyrotrophic Hormone (TSH) 68/38. Der Ampulleninhalt wurde mit 0.01 m Phosphatpuffer III auf 29.4 ml verdünnt, was einer Konzentration von 5 mU/ml entspricht. Die Aufteilung und Lagerung erfolgte in Portionen zu je 700 µl in tiefgefrorenem Zustand.

HCG: Primogonyl (5000 I.U./Ampulle) der Firma Schering, Berlin, fand Verwendung.

Antikörper:

Anti-HTSH: Anti-HTSH (Kaninchen) des National Institute of Health (NIH), Bethesda, USA, wurde verwendet. Die Originallösung wurde 1:100 verdünnt in 20 ml Gläsern zu je 100 µl-Portionen eingefroren. Für den Assay war eine Weiterverdünnung der 100 µl-Potionen auf 18 ml nötig.

Präzipitationsserum: Zur Doppelantikörper-Methode wurde als Präzipitationsserum das Anti-Kaninchen-Gammaglobulin (Esel) von der Firma Wellcome bezogen: Wellcome Precipitating Serum for Radio-immunoassay (anti-rabbit globulin).

Radiojod zur Eiweißmarkierung:

Natriumjodid-J-131, bezogen von The Radiochemical Centre, Amersham, England (Best.-Nr. IBS 30). Aktivitätskonzentration 40 mCi/ml.

Rinder-Serum-Albumin (RSA):

Serum-Albumin vom Rind (ORHD 20/21), Behringwerke, Marburg. Die Absättigung der Sephadex-Säule erfolgte mit einer 2 %igen RSA-Lösung, die in Puffer II angesetzt wurde.

Puffer:

Puffer I : 0.5 m Phosphatpuffer, pH 7.5.

Puffer II : 0.01 m Phosphatpuffer, 0.9 % NaCl, pH 7.8.

Puffer III : 0.01 m Phosphatpuffer, 0.1 % RSA, 0.1 % Na-azid, 0.9 % NaCl, pH 7.4.

Puffer IV : Puffer III + 0.08 % Kaninchenserum.

Puffer I und II fanden bei der Markierungsdurchführung Verwendung. Die HTSH-Standard-Verdünnungsreihe wurde mit Puffer IV durchgeführt. Der Ansatz sämtlicher anderer Substanzen erfolgte in Puffer III.

Kaninchenserum:

Im eigenen Laboratorium gewonnen.

Sephadex G-75:

Sephadex G-75, bezogen von Deutsche Pharmacia, Frankfurt a.M.

Chemikalien:

Sämtliche zusätzlich benutzen Chemikalien wie Chloramin T (CAT) Tritriplex III (EDTA), Natriumazid und Natriumdisulfit ($Na_2S_2O_5$) wurden in hochreinen Präparationen verwendet.

2.2. Experimentelle Durchführung

Zur Durchführung der Reaktion werden 1. das markierte Hormon, 2. der spezifische Antikörper, 3. unmarkiertes Hormon für die Standardkurve bzw. Serumproben und 4. Puffer, in welchem die Substanzen gelöst werden, benötigt. Nach einer Präinkubation von 24 Stunden von unmarkiertem Hormon bzw. Serumproben und Antikörper wird das markierte Hormon hinzugefügt. Bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes benötigt der Reaktionsansatz weitere 3-4 Tage. Nach Hinzufügen des Präzipitationsserums kann nach 18-24 Stunden das Gemisch zentrifugiert werden. Die Trennung von Überstand

und Präzipitat erfolgt durch Absaugen oder Abgießen. Das Präzipitat wird in einem Szintillationszähler gemessen, und die Ergebnisse nach Erstellen der obligaten Standardkurve aus dieser abgelesen.

2.2.1. Markierung

Die Hormonmarkierung wurde nach der Methode von GREENWOOD, HUNTER und GLOVER (48) durchgeführt. Als prinzipielle Reaktionsschritte dieser Proteinmarkierung sind zu nennen: Oxydation des in Form von Natriumjodid vorliegenden radioaktiven Jods durch Chloramin T zur reaktionsfähigen elementaren Stufe. Substitution von Wasserstoffatomen an den Tyrosylresten innerhalb des Hormonmoleküls durch radioaktives Jod. Abbruch der Markierungsreaktion durch Reduktion mit Natriumdisulfit und anschließende chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte.

Zur Markierungsdurchführung wurden nacheinander in ein Mikroflexgefäß pipettiert:

5 - 10 µl Jod-131 (= 2 - 2.5 mCi)
20 µl Puffer I
5 oder 10 µl HTSH
10 µl Chloramin T (2.5 mg/ml Puffer II)

Nach 60 Sekunden Schütteln wurden zur Unterbrechung des Oxydationsvorganges 20 µl $Na_2S_2O_5$ (3 mg/ml Puffer II) zugegeben. Die Trennung des markierten Hormons vom überschüssigen Jod und den Oxydations- bzw. Reduktionsmitteln erfolgte mit Hilfe der Gelfiltration an einer Sephadex G-75-Säule (Durchmesser 1 cm, Füllhöhe 18 cm).

Im Zuge der Präparationen wurde die Sephadex-Säule mit 50 ml Puffer II gespült und zur Absättigung von Proteinadsorptionsstellen mit 1 ml einer 2 %igen Rinder-Serumalbumin-Lösung beschichtet. Danach erfolgte eine erneute Spülung mit 60 ml Puffer II, um überschüssiges, nicht adsorptiv festgehaltenes Protein zu entfernen.

Das Reaktionsgemisch wurde nach Unterbrechung des Oxydationsvorganges durch Natriumdisulfit mit einer Pasteurpipette auf die Säule übertragen. Nach zweimaligem Spülen des Markierungsgefäßes mit Puffer II und Übertragen auf die Sephadex-Säule ließ man den Überstand einziehen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer II gespült und das Eluat in Fraktionen zu 0.5 ml = 8 Tropfen aufgefangen. In den Elutionsröhrchen waren 50 µl einer 2 %igen Rinder-Serumalbumin-Lösung vorgegeben.

Nach der Elution von 40 Fraktionen wurden die Elutionsröhrchen, das Markierungsgefäß und die zur Überführung des Markierungsgemisches und Spülung benutzte Pasteurpipette am Millicuriemeter auf ihre Aktivität gemessen.

Zur Bestimmung der nicht überführbaren Restaktivität im Markierungsgefäß wurde dieses mit einem "Spülcocktail" folgender Zusammensetzung inkubiert: 50 % Humanserum, 5 % Kaliumjodid, 0.5 % $Na_2S_2O_5$ und ca. 1 mU Standard-HTSH/ml. Diese Substanzen sollen das an der Wand des Markierungsgefäßes adsorbierte markierte HTSH und radioaktive Jod nach dem Prinzip einer kompetitiven Reaktion von ihren Haftstellen verdrängen und in den "Spülcocktail" übergehen lassen. Das zugesetzte Natriumdisulfit verhindert eine eventuelle Markierung des Proteins während der Inkubation. Nach einem Tag wurde der Inhalt des Markierungsgefäßes in ein Zentrifugenglas überführt und die Aktivität der Spüllösung gemessen. Das gesamte Protein der Spüllösung, das das markierte HTSH mit einschließt, wurde nun zur Trennung vom nicht gebundenen Jod durch Trichloressigsäure (TCE) gefällt. Nach der Zentrifugation des Gemisches wurde der Überstand, in dem sich das freie Jod befindet, abgegossen und die Aktivität des Präzipitates mit dem darin enthaltenen markierten Hormon gemessen. Dieser Betrag wurde in Beziehung gesetzt zur Gesamtaktivität der in das Reagenzglas überführten Lösung. Er wurde in Prozent ausgedrückt und als TCE-Faktor bezeichnet. Dieser Faktor gibt den prozentualen Anteil des markierten Hormons in der Spüllösung und damit im Markierungsgefäß an.

Abb. 3 zeigt ein Markierungsprotokoll, das bei jeder Markierungsdurchführung in dieser Form geführt wurde.

MARKIERUNGSPROTOKOLL NR. TSH 19 Dat. 8 6. 72

Radiojod : J-131 / ~~J-125~~ Fa.: Amersham / ~~Hoechst~~

Vol.: 5 µl

Wirkungsdauer CAT : 60 sec Hormoneinsatz : 5 µg TSH

Aktivitätsbilanzmessungen

Gefäß vor Markierung : 2.76 mCi Nach Mark.: Gefäß 310 µCi

Pasteurpipette 150 "

460 "

Säulentrennung an Sephadex G-75 : Ø 1 cm; Füllhöhe 18 cm.

Frkt.	Akt. (µCi)	Frkt.	Akt. (µCi)
1		21	34
2		22	25
3		23	22
4		24	20
5...		25...	19
6		26	24
7		27	25
8		28	33
9		29	34
10...		30...	
11		31	
12	246	32	
13		33	
14		34	
15...		35...	
16		36	
17		37	
18		38	
19		39	
20		40	

Akt. Hormonpeak : 1659 µCi

Akt. Gesamteluat : 2035 µCi

Markierungsausbeute im Eluat : 81.5 %

Hormonanteil in Restaktivität : 40 %

Gesamte Hormonaktiv.: 2073 µCi

Spez. Hormonaktivität : 414 µCi/

markiertes Hormon/ Röhrchen : 0,05 ng

(Fraktion 12 Verd. 1:300)

Abb.3: Beispiel eines Markierungsprotokolls.

Tabelle I

Pipettierschema in Mikroliterangaben für den TSH-Radioimmunoassay.

Substanzen	Blank	B_o-Proben	Standardkurve	Testseren	Gesamtaktivität
Puffer I	100	-	-	-	-
Puffer II	400	400	200	400	-
EDTA + HCG	100	100	100	100	-
HTSH-Stand.Verd.	-	-	200	-	-
TSH-freies Serum	300	300	300	-	-
Testseren	-	-	-	300	-
1.Antikörper	-	100	100	100	-
HTSH	100	100	100	100	100
Präzipit.-Serum	100	100	100	100	-
Gesamtinhalt	1100	1100	1100	1100	100

Von den 3-4 Fraktionen mit der stärksten Hormonaktivität wurden sofort Verdünnungen von 1:100 mit Puffer III hergestellt. Zuvor wurde von jeder Fraktion eine Probe zur elektrophoretischen Auftrennung entnommen.

Die Elektrophorese wurde auf Whatman 3 MM-Papier einer Streifengröße von 3.5 x 46 cm in Barbitalpuffer, pH 8.6, durchgeführt. Die Auftragungsmenge betrug 20 µl Originaleluat. Dauer der Elektrophorese: 90 min bei 300 V. Nach Trocknung der Streifen wurde deren Aktivitätsverteilung mit einem Dünnschichtscanner ermittelt. Die graphische Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte über einen angeschlossenen Schreiber, während über einen parallel geschalteten Drucker die Impulse pro Zeiteinheit registriert wurden. Wiesen die so geprüften Hormonfraktionen keine Verschmutzungen auf, wurden sie auf ihre im Radioimmunoassay verwandte Endverdünnung von 10000-15000 Imp/min/100 µl an einem Bohrloch-Szintillationszähler eingestellt.

2.2.2. Ansatz und Durchführung der radioimmunologischen Bestimmung

Sämtliche Pipettierungen wurden mit automatischen Pipetten durchgeführt: Mikropipetten Marburg (Firma Eppendorf); Hamilton-Pipette; Oxford-Pipettor. In die 10 x 90 mm Glasröhrchen wurden der Reihenfolge nach pipettiert (Tab. I):

1. 200 µl Puffer IV für die Standardkurve bzw. 400 µl Puffer IV für die Serumproben (Oxford-Pipettor).
2. 200 µl steigender HTSH-Standardverdünnungen zum Erstellen der Standardkurve (Mikropipette Marburg). Die einzelnen Verdünnungsschritte sind in Tabelle II aufgeführt.
3. 100 µl 0.05 m EDTA-Lösung + 10 I.U. HCG (Hamilton-Pipette).
4. 300 µl TSH-freies Serum bzw. zu bestimmende Serumproben (Mikropipette Marburg).
5. 100 µl anti-HTSH (Hamilton-Pipette).

Tabelle II

Ansatz der HTSH-Standard-Verdünnungsreihe:

µU TSH/Röhrchen	Verdünnungsschritte					
100	1.	250 µl	Original-TSH	+ 2.25	ml	Puffer I
50	2.	1 ml	1)	+ 1	"	"
32	3.	1 ml	1)	+ 1	"	"
25	4.	1 ml	2)	+ 1	"	"
16	5.	1 ml	3)	+ 1	"	"
12.5	6.	1 ml	4)	+ 1	"	"
8	7.	1 ml	5)	+ 1	"	"
6.25	8.	1 ml	6)	+ 1	"	"
4	9.	1 ml	7)	+ 1	"	"
3.125	10.	1 ml	8)	+ 1	"	"
2	11.	1 ml	9)	+ 1	"	"
1.56	12.	1 ml	10)	+ 1	"	"
1.25	13.	200 µl	8)	+ 0.8	"	"
1	14.	1 ml	11)	+ 1	"	"
0.78	15.	1 ml	12)	+ 1	"	"
0.5	16.	1 ml	14)	+ 1	"	"
0.39	17.	1 ml	15)	+ 1	"	"
0.25	18.	1 ml	16)	+ 1	"	"

Zur Erhöhung der Sensibilität der Standardkurve wurde die Zugabe des markierten Produktes um 24 Stunden verzögert (49). Während dieser Zeit wurden die Proben bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von

6. 100 µl HTSH (Hamilton-Pipette).

Zur Trennung der freien von der gebundenen Aktivität wurde nach 4-tägiger Äquilibrierung bei 4°C die Doppelantikörper-Methode angewendet. Dazu wurden

7. 100 µl Präzipitationsserum (1:20, Hamilton-Pipette) einpipettiert.

Nach den Pipettierschritten 5, 6, 7 wurden die Proben gemischt (Wirli-Mixer). Die Präzipitationsreaktion ist nach ca. 18 Stunden abgeschlossen. Danach wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge bei 3000 Umdrehungen 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Aktivität jedes Röhrchens in einem Szintillationszähler mit automatischem Probenwechsler 5 Minuten gezählt.

Die Antikörpertitration erfolgte unter den gleichen wie oben angegebenen Inkubationsbedingungen. Dabei wurden die Proben bei Abwesenheit des unmarkierten Hormons, d.h. der HTSH-Standardverdünnungen, mit steigenden Verdünnungen des Anti-HTSH-Serums inkubiert, und der jeweilige Anteil des gebundenen markierten Hormons ermittelt.

Neben der Standardkurve und den zu bestimmenden Patientenseren wurden als obligatorische Proben in jeder Versuchsreihe mitbestimmt:

A. Eine Probe, die anstelle des Anti-HTSH-Serums Puffer enthielt. Sie diente zur Feststellung der unspezifisch präzipitierten Radioaktivität (Blank) aufgrund von Adsorptions- und Fällungsprozessen zwischen markiertem Hormon oder dessen Degradationsprodukten und anderen im Ansatz vorliegender Komponenten. Dieser Wert wird von sämtlichen ermittelten Ergebnissen abgezogen.
B. Eine Probe, die nur markiertes Hormon enthielt und die eingegebene Aktivität pro Röhrchen anzeigt (T).
C. Eine Probe, die kein unmarkiertes Hormon enthielt. Sie stellte die

maximal zu fällende Radioaktivität (B_0) bei der verwendeten Anti-HTSH-Verdünnung dar.

D. Drei Proben, die sog. Kontrollseren, die TSH-Konzentrationen aus dem unteren, mittleren und oberen Meßbereich enthielten. Sie dienten der Ermittlung der Reproduzierbarkeit des radioimmunologischen Verfahrens innerhalb der verschiedenen Ansätze.

Alle Proben der Standardkurve und der Testseren wurden in dreifacher, alle Kontrollwerte (Proben A - D) in vierfacher Ausführung angesetzt. Die Proben wurden während der gesamten Assay-Durchführung bei 4°C gekühlt gehalten.

2.2.3. Radioaktivitätsmessung

Zur Aktivitätsmessung der beim Markierungsvorgang anfallenden Proben diente eine Ionisationskammer in Verbindung mit einem direkt anzeigenden Meßgerät (Philips Microcuriemeter). Die Meßanordnung gestattete eine direkte Radioaktivitätsablesung für Jod-131 in µCi oder mCi. Alle weiteren Aktivitätsmessungen wurden mittels Einkanal-Gammaspektrometrie unter Benutzung automatischer Probenwechsler der Marken Packard Automatic Control, model 578, und Tracerlab gamma/guard 150 durchgeführt. Als Dedektoren dienten NaJ(Tl)-Bohrloch-Szintillationszähler.

Die Meßzeit der das Präzipitat enthaltenden Röhrchen betrug 5 Minuten. Nach Messung der unter Punkt A als Blank bezeichneten Proben wurde für alle weiteren Proben eine automatische Substraktion des Bachground vorgenommen, der sich aus den Zählraten des natürlichen Strahlenuntergrundes sowie des Blank zusammensetzt.

Zusätzlich wurde für sämtliche Meßwerte eine Zerfallskorrektur für Jod-131 durchgeführt. Bei einer Einzelmeßdauer von 5 min pro Röhrchen beträgt die Gesamtmeßdauer für 100 Röhrchen ca. 10 Stunden. Für die zuletzt gemessenen Werte bedeutete dies, bedingt durch die kurze Halbwertszeit des Jod-131 von 8.08 Tagen, einen relativen Aktivitätsverlust gegenüber entsprechenden Proben zu Beginn der Messung. Da sämtliche Meßwerte auf die

unter Punkt C als B_o bezeichneten Proben bezogen wurden, erfolgte für alle anderen Ergebnisse eine Korrektur auf den Meßzeitpunkt der B_o-Proben. Somit wurden fälschlich zu hoch bzw. zu niedrig ermittelte Werte, deren Ursache durch die physikalischen Eigenschaften des Isotops und die langen Meßzeiten bedingt sind, ausgeschlossen.

2.2.4. Qualitätskontrolle

Zur statistischen Qualitätskontrolle des TSH-Radioimmunoassay wurde die Präzision, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Wiederfindung des Verfahrens herangezogen.

Die Präzision der Standardkurven wurde in Form des Präzisionsindex λ angegeben. Man erhält ihn nach Linearisierung der Standardkurve durch das Logit-Verfahren aus der Standardabweichung aller Einzelmeßpunkte und der Steigung der Regressionsgeraden. Die Empfindlichkeit wurde durch den TSH-Wert, der bei 1/2 B_o/T vorliegt, und der Steigung der linearisierten Standardkurve bestimmt. Die Reproduzierbarkeit von Testergebnissen wurde durch Mehrfachbestimmung einer Probe in einem Ansatz und durch drei verschiedene Kontrollseren, die bei jeder Testdurchführung obligatorisch mitbestimmt wurden, geprüft. Die Wiederfindung bekannter TSH-Konzentrationen wurde durch Zugabe steigender TSH-Konzentrationen zu einem Normalserum und anschließender experimenteller Überprüfung der TSH-Werte ermittelt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Ergebnisse zu methodischen Untersuchungen

3.1.1. Markierung

Im Verlauf der Radioimmunoassay-Durchführung wurden Versuche zur Steigerung der spezifischen Aktivität des markierten Hormons durchgeführt. Unter Beibehaltung der Markierungsmethodik wurde das mengenmäßige Verhältnis von zu markierendem Hormon und Radiojod geändert. Die Aktivität wurde mit ca. 2.5 mCi pro Markierungsansatz in etwa konstant gehalten, während der TSH-Einsatz mit 2.5, 5 und 10 µg wechselte. Als Bewertungsparameter wurden die Markierungsausbeute und die spezifische Aktivität herangezogen. Als Markierungsausbeute wird der prozentuale Gehalt des in den Elutionsröhrchen aufgefangenen Markierungsgemisches an markiertem Hormon nach Passieren der Sephadex-Säule bezeichnet. Die spezifische Aktivität des markierten Hormons setzt sich zusammen aus der Aktivität des Hormonanteils des Eluats nach der Gelfiltration zuzüglich des Hormonanteils im Markierungsgefäß, der durch die Bestimmung des TCE-Faktors meßbar wird.

Wie die Messungen des Markierungsgefäßes nach Übertragen des Markierungsgemisches auf die Sephadex-Säule ergaben, bleibt in diesem trotz sorgfältigem, mehrmaligem Spülen meist eine beträchtliche Restaktivität zurück, die - abhängig vom TSH-Einsatz - bis zu 30 % der gesamten zur Markierung eingegebenen Aktivität betragen kann. Zur Errechnung der spezifischen Aktivität des markierten Hormons ist diese Restaktivität nicht zu vernachlässigen. Jedoch darf nicht dasselbe Verhältnis von markiertem Hormon und freiem Jod, wie es sich aus dem Eluat ergibt, in Rechnung gestellt werden. Die Vermutung, daß aufgrund von Adsorptionseffekten weit mehr markiertes Hormon als nicht gebundenes radioaktives Jod im Markierungsgefäß zurückgehalten wird, konnte mit Hilfe der Trichloressigsäure-Fällung bestätigt werden. Insbesondere bei Markierungen mit einem niedrigen TSH-Einsatz von 2.5 µg differiert das Verhältnis von markiertem Hormon zu freiem Jod im Eluat stark von dem im Markierungsgefäß. Bei einem TSH-Einsatz von 5 µg weichen diese Ver-

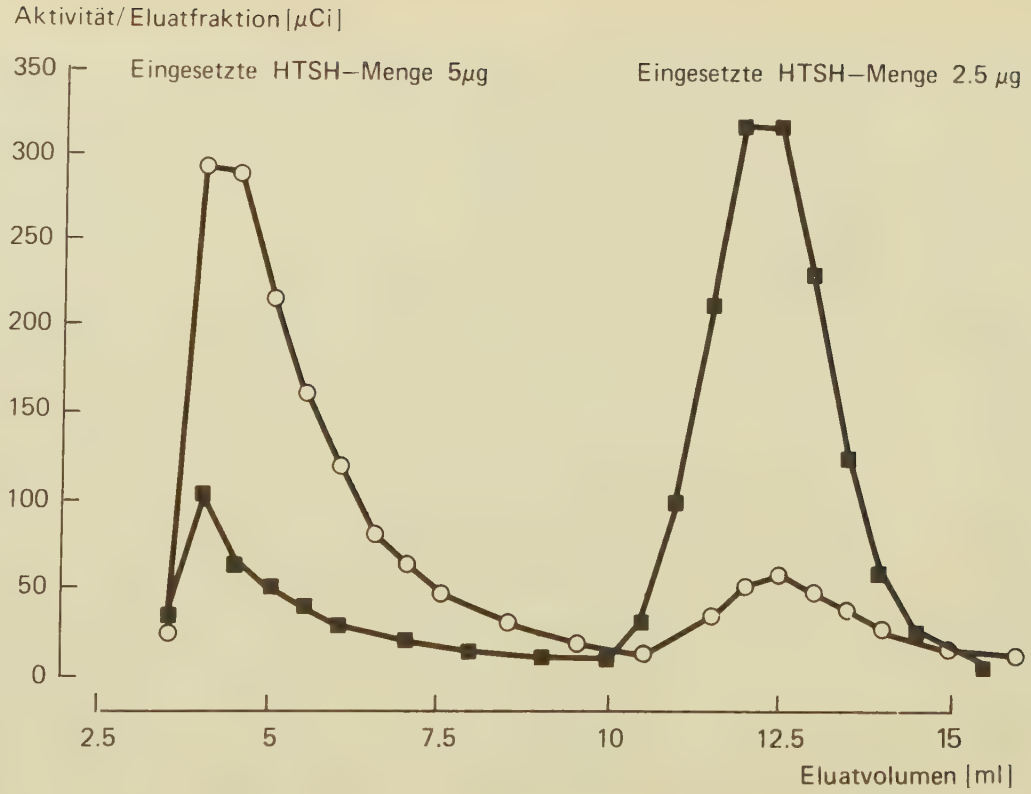


Abb.4: Elutionsdiagramm nach Sephadex-Gelfiltration des Markierungsgemisches bei 2.5 bzw.5 μg TSH-Einsatz.

hältnisse im Eluat und Markierungsgefäß nicht mehr so stark voneinander ab. Durch die Berücksichtigung des TCE-Faktors ergab sich bei der Berechnung der spezifischen Aktivität eine deutliche Steigerung deren Werte.

Abb. 4 zeigt als Beispiel ein Elutionsdiagramm nach Markierung von 2.5 bzw. 5 µg TSH. Das Hormon befindet sich nach der Auftrennung durch die Sephadex-Säule im ersten Aktivitätspeak.

Die Ergebnisse aller durchgeführten Markierungen sind in Tabelle III aufgeführt. Bei einem TSH-Einsatz von 2.5 µg pro Markierung beträgt die mittlere Markierungsausbeute 32.9 % (16 - 53 %, n = 16). Zur Errechnung der spezifischen Aktivität ist - wie oben erläutert - der TCE-Faktor nicht zu vernachlässigen, der im Mittel 72 % (43 - 90 %, n = 16) betrug. Unter Berücksichtigung dieser Werte ergab sich bei den Markierungen mit 2.5 µg TSH eine mittlere spezifische Aktivität des markierten Hormons von 331 mCi/mg TSH (200 - 567 mCi/mg, n = 16). Mit der Erhöhung des TSH-Einsatzes auf 5 µg pro Markierung konnte eine erhebliche Steigerung der Markierungsausbeute erzielt werden (s. Abb. 4). Sie betrug im Mittel 78.4 % (66.4 - 87 %, n = 13). Wie der TCE-Faktor ergab, lag der Hormonanteil der Restaktivität ebenfalls in diesem Bereich. Im Gegensatz zur Steigerung der Elutionsausbeute erhöhte sich jedoch die spezifische Aktivität nur geringfügig auf 364 mCi/mg TSH (310 - 431 mCi/mg, n = 13) bei 5 µg TSH-Einsatz. Versuche mit 10 µg TSH pro Markierungsansatz ergaben eine ähnlich hohe Markierungsausbeute wie beim Einsatz von 5 µg TSH bei jedoch deutlich verminderter spezifischer Aktivität. Bei einem TSH-Einsatz von 2.5 µg scheint die geringe Hormonmenge der limitierende Faktor der niedrigen Markierungsausbeute zu sein. Bei einer Eingabe von 10 µg TSH ist die Abnahme der spezifischen Aktivität durch die - im Verhältnis zur eingegebenen ^{131}J-Aktivität - relativ zu hohe Hormonmenge bedingt. Mit einem Einsatz von 5 µg TSH und 2.5 mCi Radiojod scheint somit ein optimales Verhältnis von Hormon zur Menge des radioaktiven Jods erreicht zu sein. Als Mittelwert aller Markierungen resultiert eine spezifische Aktivität von 347.3 mCi/mg TSH (200 - 567 mCi/mg, n = 29).

Tabelle III

Ergebnisse der durchgeführten Markierungen:

Markierung-Nr.	TSH-Eingabe (µg)	Ausbeute (%)	Aktivität (mCi)	spez. Aktivität (mCi/mg)	TSH/Rö (pg
1	2.5	37.5	2.5	308	142
2	"	17.9	2.4	200	92
3	"	22	2.4	321	120
4	"	39.8	2.3	387	103
5	"	24	2.3	204	159
6	"	30.6	2.5	304	131
7	"	13.5	2.95	275	140
8	"	41.6	2.23	390	106
9	"	40.5	2.44	266	118
10	"	47.1	1.8	280	125
11	"	25.4	2.2	255	161
12	"	38.8	1.95	380	98
13	"	51	3.2	478	40
14	"	53	2.05	441	50
15	"	16	2.26	251	119
16	"	28	2.3	567	34
17	5	82	2.07	318	64
18	"	81	3	431	48
19	"	82	2.67	415	51
20	"	77	2.5	380	54
21	"	80	2.48	366	43
22	"	75	2.57	350	63
23	"	87	2.5	374	49
24	"	78	2.5	351	54
25	"	80	2.5	377	42
26	"	66.4	2.45	310	61
27	"	83	2.32	355	52
28	"	73	2.54	350	48
29	"	75	2.57	343	50

Die Durchführung dieser Versuche erfolgte unter dem Aspekt einer Sensibilitätssteigerung des Radioimmunoassay durch Verwendung markierten Hormons hoher spezifischer Aktivität. Hohe spezifische Hormonaktivitäten ermöglichen einerseits eine starke Verdünnung des Markierungsproduktes und vermindern so die absolut einzugebende Menge an markiertem Hormon pro Inkubationsröhrchen. Auf der anderen Seite kann dadurch auch der Antikörper in einer höheren Verdünnung benutzt werden. Je geringer die Konzentration von markiertem Hormon und Antikörper pro Teströhrchen gewählt werden kann, umso kleinere Mengen von unmarkiertem Hormon führen zu einer Verdrängung des markierten Hormons vom Antikörper und damit zu ihrem Nachweis, d.h. die Nachweisschwelle für unmarkiertes Hormon wird gesenkt.

Obwohl die Benutzung kleinster Konzentrationen von markiertem Hormon im Sinne einer Sensibilitätssteigerung des Radioimmunoassay vorteilhaft erscheint, beinhalten Präparationen hoher spezifischer Aktivität aber die Gefahr einer Schädigung des Hormonmoleküls, die zu einer Beeinträchtigung der immunologischen Reaktion führen könnte. Dadurch ist eine Grenze in der kritiklosen Erhöhung der spezifischen Aktivität gesetzt.

In der Diskussion um die Vor- und Nachteile des für die Markierung von TSH zu verwendenden Radionuklids, Jod-131 oder Jod-125, wird von den verschiedenen Autoren (50-52) kein gemeinsamer Standpunkt vertreten. Nachteilig bei der Verwendung von Jod-131 ist dessen relativ kurze Halbwertszeit von 8.08 Tagen, die Neumarkierungen für jeden Ansatz nötig macht. Die Halbwertszeit von Jod-125 beträgt 57.4 Tage. Demnach können mit diesem Nuklid markierte Hormone über mehrere Assays verwandt werden. Zur Reinigung der markierten Hormonfraktion von ihren lagerungsbedingten Degradationsprodukten genügen Nachreinigungen vor der jeweiligen Durchführung des neuen Ansatzes.

V.z.MÜHLEN et al. (53) und FRANCHIMONT (54) sind jedoch sowohl bei ^{131}J-markiertem als auch ^{125}J-markiertem Hormon skeptisch in der Bewertung des Einsatzes markierter Produkte über einen längeren Zeitraum. Betrachtet man als Gradmesser für die Verunreinigungen eines Markierungsproduktes die Bindung des markierten Hormons - bei Abwesenheit von unmar-

kiertem Hormon - an den Antikörper, so nimmt deren Größe mit zunehmender Lagerungsdauer ab. Wie FRANCHIMONT (54) zeigen konnte, vermindert sich der Bindungswert von 50 % am 1. Tag nach der Markierung auf 32 % am 15. Tag. Selbst durch chromatographische Nachreinigung ließ sich dieser Wert nur auf 39 % verbessern. In Anbetracht der entscheidenden Bedeutung der Reinheit des markierten Hormons und dessen Bindungsfähigkeit an den Antikörper für die Sensibilität des gesamten Verfahrens scheint FRANCHIMONT eine Anwendung markierten HTSH über eine Zeit von mehr als 10 Tagen zweifelhaft. Eine andere Arbeitsgruppe (55) wiederum benutzt entsprechende Markierungen bis zu fünf Monate.

Von V. z. MÜHLEN et al. (56) wurde HTSH unter gleichen Bedingungen mit Jod-131 und Jod-125 markiert. Dabei konnte festgestellt werden, daß die spezifische Aktivität des ^{125}J-markierten Hormons bedeutend niedriger ausfällt als die des mit ^{131}J-markierten Produktes. Die Folge dieser geringeren spezifischen Aktivität von ^{125}J-HTSH ist eine absolut höhere Hormoneingabe in den Inkubationsansatz als bei Benutzung von ^{131}J-markiertem HTSH. Aus den oben erörterten Gründen ist ein Sensibilitätsverlust zu erwarten.

In Anbetracht der geringeren spezifischen Aktivität von ^{125}J-markiertem gegenüber ^{131}J-markiertem Hormon sowie einer Empfehlung des NIH, das die benötigten Grundsubstanzen zur Verfügung stellte, wurde bei der Durchführung des hier beschriebenen Verfahrens mit ^{131}J-markiertem HTSH gearbeitet.

Elektrophorese:

Nach jeder Markierung wurden vor dem Einsatz des markierten Produktes im Radioimmunoassay die Elutionsfraktionen des Hormonpeak, die die höchsten Aktivitäten enthielten, einer elektrophoretischen Auftrennung unterzogen. Neben einer möglichst hohen spezifischen Aktivität ist die Reinheit des markierten HTSH ein wichtiges Kriterium für seine Anwendung. Mit Hilfe der Chromatoelektrophorese soll geprüft werden, ob die Trennung von Hormon und freiem Jod durch die Sephadex-Säule vollständig gelungen ist, und inwieweit dem markierten Hormon markierte Degradationsprodukte beigemengt sind. Diese Verunreinigungen können die immunchemischen Eigenschaften und die unspe-

zifische Präzipitation negativ beeinflussen. Nur Fraktionen, die nach der elektrophoretischen Auftrennung keine Verunreinigungen aufweisen, wurden im Radioimmunoassay eingesetzt.

Wie bereits beschrieben, wurden vor der Durchführung der Gelfiltration in die Elutionsröhrchen jeweils 50 µl einer 2 %igen Rinderalbumin-Lösung pipettiert. Zur Fraktionierung der getrennten Substanzen wurden in jedem Röhrchen 0.5 ml Eluat aufgefangen, so daß die Konzentration an Rinderalbumin 0.2 % betrug. In dieser Konzentration diente es bei der Papier-Elektrophorese als Träger für die bei der Markierung entstandenen Degradationsprodukte und bewirkte deren deutliche Abgrenzung vom markierten HTSH.

In Abb. 5 ist die elektrophoretische Auftrennung des Markierungsgemisches (a) und die einer Elutionsfraktion nach Durchlaufen der Sephadex-Säule (b) zu sehen. Abb. 5a zeigt unmittelbar am Start den Hormonpeak, gefolgt von einem kleineren Peak, der die markierten Hormonbruchstücke darstellt. Am weitesten wandert bei der Auftrennung das als Jodid vorliegende freie ^{131}J. In Abb. 5b ist die Elektrophorese einer Elutionsfraktion, wie sie für den Einsatz im Radioimmunoassay verwendet wurde, wiedergegeben. Nach Passage der Sephadex-Säule stellt sich die Hormonfraktion frei von jeglichen Verunreinigungen bzw. freiem ^{131}J dar.

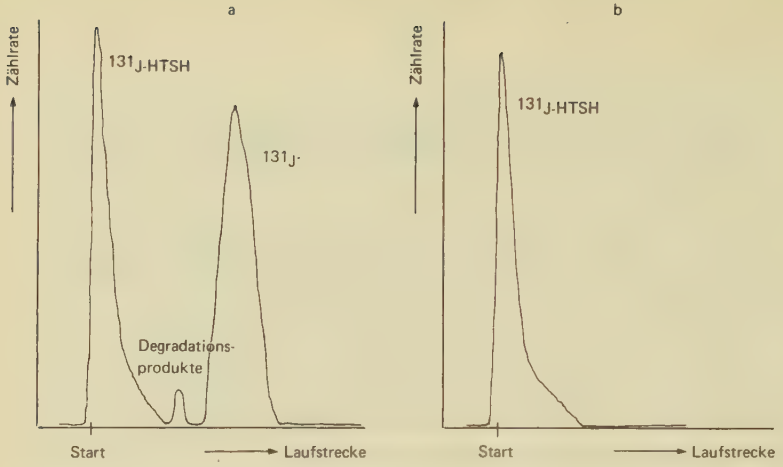


Abb.5: Chromatoelektrophoretische Prüfung von ^{131}J-markiertem HTSH.
a) Reaktionsgemisch nach Markierung,
b) Markiertes Hormon nach Reinigung durch Gelfiltration an Sephadex G-75.

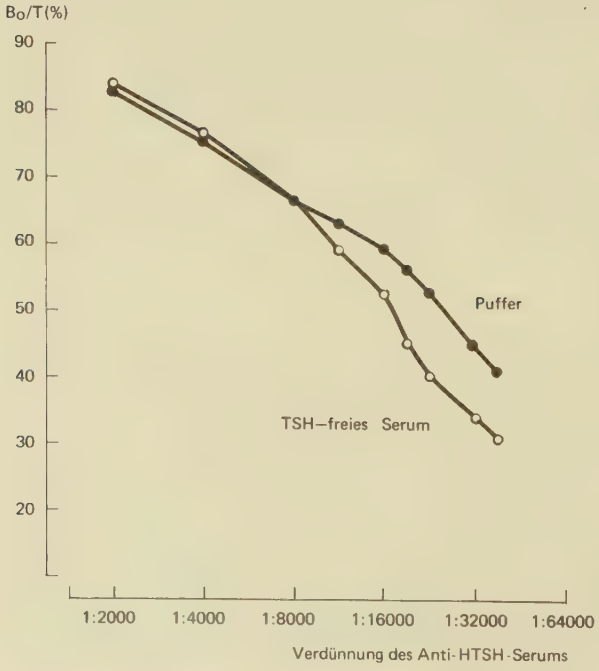


Abb.6: Titration des Anti-HTSH-Serums in Puffer und TSH-freiem Serum.

3.1.2. Antikörpertitration

Das für radioimmunologische Bestimmungen vorgesehene hormonspezifische Antiserum muß vor der Benutzung im Radioimmunoassay auf seine anzuwendende Endverdünnung ausgetestet werden. Für die Durchführung des Verfahrens wird eine Antiserumkonzentration gewählt, bei der 50 - 70 % des markierten Hormons gebunden werden (55).

Eine Antikörperverdünnung, die 50 - 70 % der bindungsfähigen Radioaktivität fällt, wird aus zwei Gründen gewählt:

1. weil als Voraussetzung jedes Radioimmunoassay der Antikörper im Unterschuß vorliegen muß,
2. weil bei diesen Bindungswerten die Titrationskurve die größte Steilheit aufweist, und damit die Empfindlichkeit der radioimmunologischen Bestimmung verbessert wird.

Auf den Test bezogen bedeutet dies, daß unter den oben genannten Bedingungen schon kleinste Hormonkonzentrationen in der Lage sind, mit dem markierten Hormon in Konkurrenz zu treten und dieses vom Antikörper zu verdrängen. Das Resultat ist eine Sensibilitätssteigerung mit Nachweisbarkeit geringerer Hormonkonzentrationen im Serum.

Bei der Durchführung früherer radioimmunologischer Bestimmungen wurde z.T. mit Antikörperverdünnungen gearbeitet, die 50 - 70 % der gesamten Radioaktivität fällten. Unter der Annahme, daß ein Teil des markierten Hormons durch den Markierungsvorgang geschädigt wird, seine immunologische Kompetenz verliert und für die Antigen-Antikörper-Reaktion ausfällt, läge der Antikörper in einem relativen Überschuß vor. Man würde nicht, wie gefordert, im steilsten, sondern in einem flacheren Kurventeil der Antikörpertitrationskurve bei faktisch geringerer Antiserumverdünnung arbeiten. Für den radioimmunologischen Test bedeutete dies eine Sensibilitätsminderung, da größere Hormonkonzentrationen zur Verdrängung des markierten Hormons nötig wären. Die untere Nachweisgrenze würde in einen höheren Bereich verschoben.

Abb. 6 zeigt die in Puffer und in TSH-freiem Serum ermittelten Titrations-

kurven. Bei einem Überschuß des Antikörpers in der Anfangsverdünnung von 1:2000 (Endverdünnung 1:20000) beträgt die Bindung für den Serumansatz 84.1 %, für den Pufferansatz 83.3 % der Gesamtaktivität. Bis zu einer Antikörperverdünnung von 1:8000 pro 100 µl sind keine beträchtlich abweichenden Bindungskapazitäten zwischen beiden Systemen festzustellen. Mit steigender Verdünnung macht sich der störende Einfluß unspezifischer Serumeffekte zunehmend bemerkbar. Bei einer Antiserumverdünnung von 1:24000 pro 100 µl beträgt die Bindungsdifferenz 10 % und steigt bis auf 11 % bei einer Verdünnung von 1:40000 pro 100 µl Pipettiervolumen an. Die möglichen Gründe der Bindungsabnahme bei Zugabe von Serum werden bei der Diskussion der Standardkurve erörtert.

Für die Versuchsdurchführung wurde für die Serumproben und die in TSH-freiem Serum angesetzte Standardkurve eine Anti-HTSH-Verdünnung von 1:18000 pro 100 µl Pipettiervolumen gewählt. Das entspricht bei 1 ml Endinkubationsvolumen einer Endverdünnung des Antiserums von 1:180000. Standardkurven in Puffer liefen mit einer Verdünnung von 1:24000 (Endverdünnung 1:240000). Die Antikörperkonzentration wurde für sämtliche Ansätze konstant gehalten.

Trotz Konstanthaltung der Antiserumverdünnung ergaben sich im allgemeinen bei jedem Neuansatz eines TSH-Assay schwankende B_0/T-Werte. D.h. jeder Ansatz und damit jede Markierung wiesen - bei Abwesenheit von unmarkiertem Hormon - differierende Bindungen von markiertem Hormon an den Antikörper auf. Dies läßt sich auf Unterschiede in Reinheit und immunchemischer Kompetenz des jeweiligen Markierungsproduktes zurückführen. Trotz Standardisierung des Markierungsvorganges sind die für jeden Ansatz neu durchgeführten Markierungen durch Degradationsprodukte mehr oder weniger verunreinigt. Selbst elektrophoretisch saubere Fraktionen stellen keinen ausreichenden Maßstab für Reinheit und optimale Reaktion mit dem Antikörper dar.

Versuche einer weiteren chromatographischen Auftrennung verliefen wenig erfolgreich. Nach Chromatographie der elektrophoretisch reinsten Fraktion des markierten HTSH auf einer zweiten Sephadex G-75-oder G-100-Säule erhöhte

sich der antikörpergebundene Anteil (B_o/T) des gereinigten Produkts (Eluatfraktion im Peakmaximum) nur unwesentlich. Ähnliche Untersuchungen wurden von v.z.MÜHLEN (53) berichtet. Als Erklärungsmöglichkeit für die schwankende Qualität von frischmarkiertem HTSH werden Unterschiede in der Isotopenhäufigkeit und Schwankungen der chemischen Zusammensetzung der für die Markierungen benutzten kommerziellen Radiojod-Präparate diskutiert (53,57).

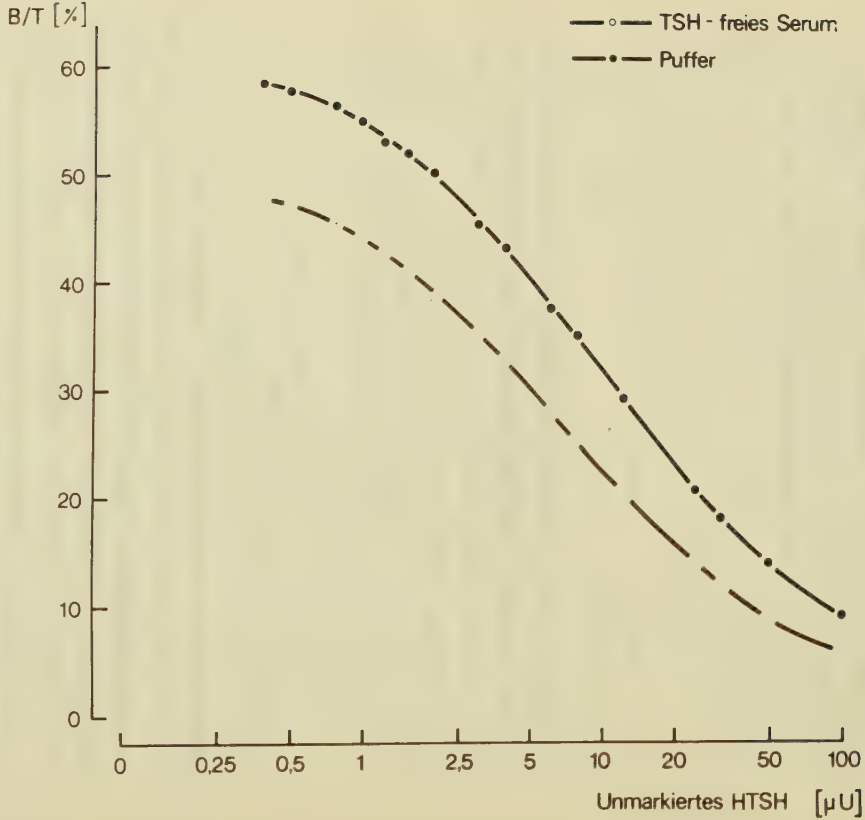
3.1.3. Standardkurve

Standardkurven sind in Puffer und TSH-freiem Serum angesetzt worden. Wie aus Abb. 7 ersichtlich, liegt die prozentuale Bindung der in TSH-freiem Serum gegenüber der in Puffer angesetzten Kurve deutlich niedriger. Als Ursachen sind zu diskutieren (58):

1. ein unspezifischer Hemmfaktor im menschlichem Serum, der dem Komplementsystem zuzurechnen ist,
2. Kreuzreaktionen des Anti-HTSH Serums mit den Gammaglobulinen des menschlichen Serums.

Serumproben aus einer in Puffer erstellten Standardkurve abgelesen, ergäben bei angenommen gleichem TSH-Gehalt aus den oben genannten Gründen eine zu niedrige prozentuale Bindung. Fälschlich zu hohe TSH-Spiegel würden resultieren. Diese unterschiedlichen Testbedingungen kann man einander angleichen, indem man den Proben der Standardkurve TSH-freies Serum zugibt, und zwar in gleichen Volumina wie die zu testenden Serumproben. Eine weitere Möglichkeit der Proteinzugabe besteht in der Anwendung von tierischen Seren, deren TSH mit dem menschlichen Anti-TSH in den meisten Fällen keine Kreuzreaktion aufweisen (54).

Menschliches TSH-freies Serum kann man auf zwei Arten gewinnen: einmal von hypophysektomierten Patienten und zum anderen unter Ausnutzung des


B/T [%]
60
50
40
30
20
10
0
TSH - freies Serum
Puffer
0
0,25
0,5
1
2,5
5
10
20
50
100
Unmarkiertes HTSH [µU]

Regelkreises Hypophyse-Schilddrüse, indem man durch Applikation des Schilddrüsenhormons Trijodthyronin (T_3) die TSH-Produktion unterdrückt.

V.z.MÜHLEN (53) verwendet zur Korrektur der unterschiedlichen Testbedingungen Serum von hypophysektomierten Patienten. Er subtrahiert von den an einer in Puffer erstellten Standardkurve abgelesenen TSH-Spiegeln einen virtuellen Meßwert eines mitbestimmten Hypophysektomierten-Serums. Diese Korrektur ist jedoch nicht exakt, da die Beeinflussung der Bindungswerte durch Zugabe von TSH-freiem Serum über den gesamten Bereich der Standardkurve nicht konstant ist (s.Abb.7). Weiterhin ist bei der Benutzung der Seren von hypophysektomierten Patienten zu beachten, daß noch Spuren von TSH enthalten sein können, da es meist nicht gelingt, das Hypophysengewebe bei der Operation restlos zu entfernen. Dieser von chirurgischer Seite geäußerte Verdacht konnte nach Erstellen dieses Radioimmunoassay durch spätere Untersuchungen an hypophysektomierten Patienten bestätigt werden, die TSH-Spiegel nach Stimulation mit TRH im meßbaren Bereich aufwiesen (59).

Für den Aufbau der hier beschriebenen TSH-Bestimmungsmethode wurde daher zur Gewinnung von TSH-freiem Serum der Gedanke der Suppression der TSH-Produktion durch T_3-Gaben verfolgt. 10 freiwillige Versuchspersonen nahmen 12 Tage lang Thybon (Fa. Hoechst) in einer Dosis von 150 µg/d. Danach wurden jeweils 300-500 ml Blut abgenommen und die daraus gewonnenen Seren im tiefgefrorenen Zustand gelagert. Erste Berichte, in denen ebenfalls die TSH-Suppression durch T_3-Applikation beschrieben wurde, wurden während der Arbeit an dieser Dissertation von PATEL et al. (60) und HALL et al. (61) publiziert. Sie verabreichten zur Gewinnung von TSH-freiem Humanserum tägliche T_3-Mengen von 80 µg über 7 Tage bzw. 120 µg über 8 Tage. Da die Feststellung einer absoluten TSH-Elimination in den gewonnenen Seren unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich ist, wurde bei den eigenen Untersuchungen zur Vermeidung jeglichen Risikos unvollständiger TSH-Suppression eine höhere T_3-Dosis appliziert, nämlich - wie oben beschrieben - 150 µg/d, wodurch ein eindeutig hyperthyreoter Zustand bewirkt wurde.

Vor Benutzung im Radioimmunoassay wurde das Serum jeder einzelnen Versuchsperson gegen einen Pool aller Suppressionsseren zur Feststellung etwaiger

TSH-Spiegel bzw. vorgetäuschter TSH-Konzentrationen durch unspezifische Serumeffekte getestet.

Tabelle IV

Bindungswerte der Einzelseren nach TSH-Suppression:

Versuchsperson-Nr.	B_{oi}/B_{op} (%)
1	115.7
2	110.4
3	99.5
4	110.4
5	100.7
6	114.5
7	96.3
8	103.8
9	93.2
10	84.5

In Tab. IV sind die prozentualen Bindungswerte der Einzelseren nach TSH-Suppression aufgelistet. Sie sind angegeben als Quotient aus der antikörpergebundenen Aktivität jedes individuellen Serums (B_{oi}) und der antikörpergebundenen Aktivität des Serumpools (B_{op}), der durch Mischen gleicher Volumina aller Einzelseren hergestellt wurde, und dessen Bindungswert definitionsgemäß gleich 100.0 % gesetzt wurde. Aus den zwischen 84.5 und 115.7 % schwankenden Einzelwerten ist ersichtlich, daß bei Benutzung des gepoolten Serums zur Erstellung einer Standardkurve die einzelnen Suppressionsseren sowohl positive ($B_{oi}/B_{op} < 100$ %) als auch "negative" TSH-Spiegel ($B_{oi}/B_{op} > 100$ %) aufweisen würden.

Bei den zwei Versuchspersonen, bei denen die Bindungswerte mit 93.2 und 84.5 % deutlich erniedrigt sind, wurde anamnestisch eine frühere Hepatitis nachgewiesen. Da in diesem Fall pathologische Serumeffekte, die unspezifische Reaktionen mit dem markierten Hormon oder mit dem Antikörper zur Folge haben, nicht ausgeschlossen werden können, wurden beide Seren bei der Herstellung des für alle späteren Messungen benutzten Pools von TSH-freiem Serum nicht verwendet. Zusätzlich zu den genannten Gründen war auch die Gefahr beim Arbeiten mit Hepatitisseren nicht zu vernachlässigen gewesen.

Zur Deutung scheinbar negativer TSH-Spiegel ist in der Literatur bisher noch nicht viel beigetragen worden. Die in Tabelle IV gehäuft auftretenden Werte mit einer Bindung von über 100 % sind zum großen Teil auf die Anwesenheit der beiden Seren mit der niedrigen Bindung von 93.2 und 84.5 % zurückzuführen. Da sie bei der ersten Messung - wie schon erläutert - im Pool enthalten waren, drücken sie die prozentuale Bindung des Gesamtpools gegenüber den Einzelseren und lassen deren Bindungswerte in einen Bereich über 100 % steigen.

Trotz allem kann aber nicht bestritten werden, daß gelegentlich bei den Messungen scheinbar negative TSH-Werte erzielt werden. Solche Werte beruhen wahrscheinlich darauf, daß mehr Aktivität in das Präzipitat gelangt als an den Antikörper gebunden ist. Diskutiert worden sind eine Bindung und Fällung der Degradationsprodukte des markierten Hormons (62) sowie die Möglichkeit einer Bindung von intaktem markierten Hormon an unspezifische Plasmaproteine (63). Insgesamt gesehen liegen bisher jedoch keine experimentell gesicherten Untersuchungsergebnisse vor, die eine umfassende Erklärung für dieses Problem bieten.

3.1.4. Kreuzreaktion mit HCG

In früheren Arbeiten zur radioimmunologischen TSH-Bestimmung sind Kreuzreaktionen des Anti-HTSH-Serums mit den Gonadotropinen luteotropes Hormon (LH) und menschlichem Choriongonadotropin (HCG) beschrieben worden (29,64,65). Eine Erklärung für diese Kreuzreaktivität lieferten Untersuchungen von PIERCE (1), der anhand der Strukturanalyse eine weitgehende Übereinstimmung im Aufbau von TSH, LH und HCG entdecken konnte. Neben diesen strukturell bedingten Faktoren werden als zweite Quelle für diese Kreuzreaktivität des benutzten Anti-HTSH-Serums Verunreinigungen der zur Antikörpergewinnung verwendeten TSH-Präparationen verantwortlich gemacht. Diese Verunreinigungen induzieren bei der Immunisierung eine Bildung von Antikörpern, die gegen LH gerichtet sind. Die benutzten Antiserumpräparationen sind demzufolge nicht spezifisch für TSH.

Das Ausmaß der Kreuzreaktion zwischen HCG, das aufgrund seiner Strukturähnlichkeit stellvertretend für das LH eingesetzt werden kann, und dem Anti-HTSH-Serum sowie die Beeinflussung der TSH-Serumwerte durch diese Störreaktion wurden ermittelt. Abb. 8 zeigt zwei Standardkurven, die ohne und mit HCG-Zusatz von 10 I.U. pro Röhrchen inkubiert wurden. Ein signifikanter Unterschied der Kurvenverläufe besonders in den niedrigen Konzentrationsbereichen ist festzustellen. So beträgt die Differenz der B/T-Werte im Bereich von 0.25 - 2 µU TSH/Röhrchen, aus dem die TSH-Normalwerte abgelesen werden, 5.8 - 4 %. Die unterschiedliche Beeinflussung des Standardkurvenverlaufs durch die HCG-Zugabe ist damit zu erklären, daß das Anti-HTSH-Serum aus den oben genannten Gründen Antikörper gegen TSH und HCG als auch gegen TSH allein besitzt. Bei niedrigen TSH-Konzentrationen werden die gemeinsamen HCG- und TSH-Bindungsstellen bei Überschuß von HCG von diesem abgesättigt. Erst höhere TSH-Konzentrationen führen zu einer kompetitiven Verdrängung von HCG und verringern das Ausmaß der Störreaktion.

Tabelle V zeigt die Beeinflussung der TSH-Serumwerte in Parallelbestimmungen mit und ohne HCG-Zusatz von 10 I.U. pro Röhrchen. Wie schon bei der Standardkurve, so macht sich auch hier der Störeffekt besonders in den

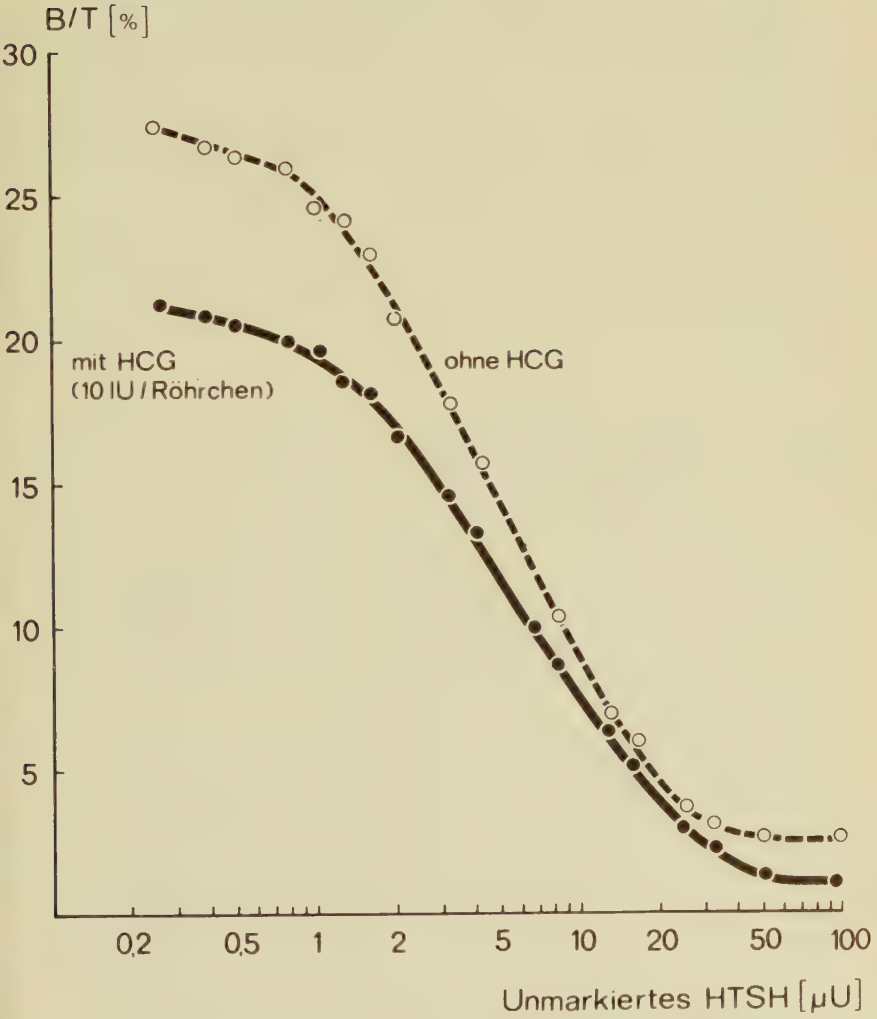


Abb.8: Standardkurven mit und ohne HCG-Zusatz.

Tabelle V

Vergleich von TSH-Bestimmungen mit und ohne 10 I.U. HCG im Inkubationsansatz.

	10 I.U. HCG	ohne HCG
Serum 1	3.8 µU/ml	6.9 µU/ml
Serum 2	14.3 "	12.8 "
Serum 3	40.0 "	36.7 "
Schwangerenserum	3.6 "	7.2 "

niedrigen TSH-Bereichen bemerkbar. Serum 1 und das Schwangerenserum weisen bei der Bestimmung ohne HCG-Zusatz doppelt so hohe TSH-Werte auf wie bei Ermittlung mit HCG-Zusatz. Serum 2 und 3 aus mittleren TSH-Konzentrationsbereichen zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihren TSH-Werten. Aufgrund des zu erwartenden unterschiedlichen Gehalts jedes einzelnen Testserums an HCG und die dadurch besonders im unteren Ablesebereich der Standardkurve bedingte deutliche Beeinflussung der TSH-Werte, wurde dem Reaktionsansatz bei der Durchführung des beschriebenen Radioimmunoassay 10 I.U. HCG pro Röhrchen zugegeben.

Mehrere Autoren haben diesen Effekt der Kreuzreaktion mit HCG beschrieben (64,65). Steigende HCG-Konzentrationen führen im HTSH-anti-HTSH-System zu einer zunehmenden Verdrängung des markierten HTSH vom Antikörper. Von einer gewissen HCG-Konzentration an stellt sich für den Störeffekt ein Plateau ein, so daß eine vollständige Hemmung der eigentlichen Reaktion selbst bei einem Überschuß von 400 I.U. HCG pro Teströhrchen nicht festgestellt werden konnte. Dieselben Ergebnisse wurden auch mit anderen Glykoproteohormonen, so dem LH, dem menschlichen Menopausen-Gonadotropin, dem Serum schwangerer Frauen und dem von Patienten mit einem Chorionepitheliom erzielt (28,54).

Allgemein werden daher dem Reaktionsansatz - wie auch hier beschrieben - 10 I.U. HCG pro Röhrchen zugegeben (54,61,64). Einigen Autoren (52,53) befürworten wegen des Bindungsverlustes, der bis zu 10 % betragen kann, die Durchführung des Radioimmunoassay ohne HCG-Zusatz. LEMARCHAND-BERAUD (65) konnte unter diesen Bedingungen im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen nur eine geringgradige Beeinflussung der TSH-Serumwerte feststellen.

Als weitere Möglichkeit in der Diskussion um die HCG-Zugabe wird von MAYBERRY et al. (52) ein HCG-Zusatz nur bei der Bestimmung von Seren schwangerer Frauen empfohlen.

3.1.5. Trennung von freiem und antikörpergebundenem HTSH

Eine vollständige Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes zur Trennung von freier und gebundener Aktivität ist eine Voraussetzung für den Erhalt exakter Ergebnisse. Die verwendete Doppelantikörper-Methode nach HALES und RANDLE (39) zeichnet sich durch Genauigkeit und einfache Durchführung aus. Bevor diese Immunpräzipitationsreaktion im hier beschriebenen TSH-Nachweisverfahren eingesetzt werden konnte, mußten in Vorversuchen die optimalen Bedingungen ermittelt werden (siehe auch Kapitel 1.2.).

Da das Anti-HTSH-Serum in sehr kleiner Konzentration im Ansatz vorliegt (Endverdünnung 1:180000), ist nach seiner Reaktion mit dem 2. Antikörper kein präzipitierender Komplex zu erwarten. Um ein intensives Präzipitat zu erhalten, mußte deshalb zusätzlich Kaninchen-Gammaglobulin als Träger in die Inkubationslösung eingebracht werden. Dies erfolgte durch Zugabe von Kaninchennormalserum.

Zur Ermittlung optimaler Fällungsbedingungen wurde markiertes HTSH in Abwesenheit von unmarkiertem Hormon unter Standardbedingungen mit Anti-HTSH inkubiert. Anschließend wurde die Fällungsreaktion bei konstanter Konzentration des Präzipitationsserums und steigenden Konzentrationen von

Kaninchenserum durchgeführt. Abb. 9 zeigt die Abhängigkeit des präzipitierten Aktivitätanteils von der Konzentration des zugesetzten Kaninchenserums. Die vorgegebene konstante Verdünnung des Präzipitationsserums betrug entsprechend dem Vorschlag der Herstellerfirma 1:20 in 100 µl Pipettiervolumen. Der Kurvenverlauf in Abb. 9 demonstriert, daß es bei einem Überschuß von Kaninchen-Gammaglobulin zu einer ungenügenden Fällung des antikörpergebundenen HTSH* kommt. Die Bindungswerte nehmen bis zu einer Menge von 1 µl Kaninchenserum pro Röhrchen ständig zu. Mit höherer Konzentration bildet sich ein Plateau mit leicht fallender Tendenz aus.

Da bei den späteren Untersuchungen schwankende Bindungskapazitäten des Präzipitationsserums nicht auszuschließen waren, wurde im folgenden in sicherem Abstand zum Gammaglobulin-Überschuß gearbeitet und eine Kaninchenserumkonzentration von 0.32 µl pro Ansatzröhrchen gewählt. Das entspricht einer 0.08 %igen Konzentration in 400 µl Pipettiervolumen Puffer IV (s. Kap. 2.1.)

Das Ergebnis dieser Versuche wurde verifiziert durch Titration des Anti-HTSH-Serums bei verschiedenen Verdünnungen des Präzipitationsserums, wobei die oben ermittelte Konzentration des zugesetzten Kaninchenserums konstant gehalten wurde. Abb. 10 zeigt das Ergebnis dieser Titrationsversuche. Die Fällung des antikörpergebundenen HTSH* wurde unter Verwendung vier unterschiedlicher Präzipitationsserum-Konzentrationen gegen steigende Anti-HTSH-Verdünnungen getestet. Bei einer Anti-HTSH-Verdünnung von 1:1000 pro 100 µl zeigt sich eine erhebliche Streuung in den Ergebnissen. Ca. 9 % beträgt die Differenz in der Fällung der gebundenen Aktivität zwischen den Präzipitationsserumverdünnungen 1:6 und 1:24/100 µl. Mit zunehmender Verdünnung des Anti-HTSH-Serums verwischen sich die differenten Ergebnisse der vier Antiserumkonzentrationen. Bei der im Assay benutzen Anti-HTSH-Verdünnung von 1:18000 sind die Unterschiede minimal, so daß aus naheliegenden Gründen die bereits vorher gewählte Präzipitationsserumverdünnung von 1:20 verwendet wurde.

Bei Anwendung der Doppelantikörper-Methode zur Trennung von freiem und

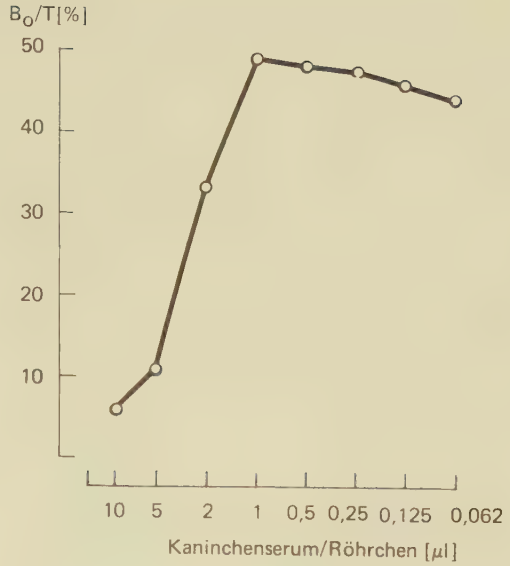


Abb.9: Abhängigkeit der antikörpergebundenen Aktivität im Präzipitat von der Kaninchenserumkonzentration. Verdünnung des Präzipitationsserums: 1:20/100 µl Pipettiervolumen.

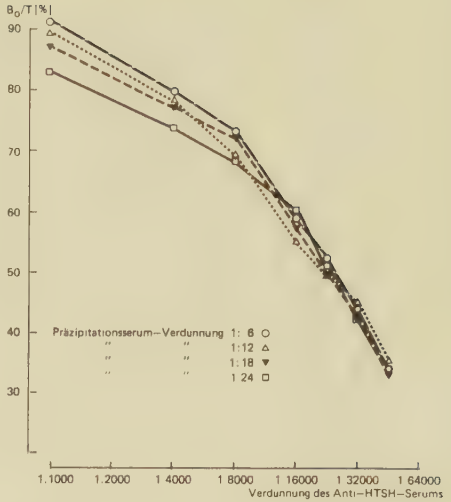


Abb.10: Titration des Anti-HTSH-Serums bei variabler Präzipitationsserum-Verdünnung.

antikörpergebundenem Hormon sind verschiedene Fehlermöglichkeiten in Betracht zu ziehen:

1. Intakte Komplementsysteme des menschlichen Serums können die 2. Antikörperreaktion hemmen. Dies führt zu einer unvollständigen Präzipitation und damit zu einer Erniedrigung der im Präzipitat gemessenen gebundenen Radioaktivität. Bei Ablesung aus der Standardkurve resultieren fälschlich zu hohe TSH-Werte (54, 65). Die Komplementreaktion ist von der Anwesenheit von Calcium-Ionen abhängig. Durch Zugabe von EDTA in den Inkubationsansatz werden sie zu einem Komplex gebunden (66), wodurch die störende Komplementreaktion mit dem 2. Antikörper inhibiert wird. Auf diese Weise läßt sich dieses Problem leicht beherrschen.

Wie von LEMARCHAND-BERAUD berichtet wurde (65), unterdrückt EDTA nicht nur die Komplementreaktion, sondern beschleunigt auch die Äquilibrierungsphase der Antigen-Antikörper-Reaktion, was zu einer Erhöhung der antikörpergebundenen Aktivität führen kann. Eigene Untersuchungen (Abb. 11) zeigen, daß die Bindung bei Zugabe des EDTA zusammen mit dem 2. Antikörper, also nach Ablauf der ersten hormonspezifischen Reaktion, abnimmt. Bei einer Verwendung in der optimalen Konzentration von 5 mMol EDTA pro Röhrchen liegt der Bindungsverlust der B_0/T-Werte im Puffersystem bei ca. 5.5 %, im Serumsystem bei ca. 4 %. Abb. 12 zeigt die Beeinflussung der Standardkurve bei Zugabe des EDTA mit dem 2. Antikörper im Serumsystem. Die Bindungswerte liegen unter diesen Bedingungen im gesamten Bereich der Standardkurve um ca. 2.5 - 5.5 % niedriger als bei Zugabe mit dem 1. Antikörper. Die Tatsache, daß die Bindung bei Zuführung des EDTA mit dem Präzipitationsserum niedriger liegt, bestätigt die von FRANCHIMONT (54) geäußerte Vermutung der Interaktion mit der 1. AG-AK-Reaktion. Der Bindungsverlust, der sich bei Ansatz der Proben in TSH-freiem Serum statt in Puffer ergibt (s. Abb. 11), kann durch EDTA nicht vermindert werden. FRANCHIMONT führt dies nicht auf die Anwesenheit der Serumproteine zurück, da ein Bindungsverlust unter Zusatz entsprechender Mengen menschlichen Serumalbumins nicht festzustellen ist. Er macht dafür einen noch nicht weiter

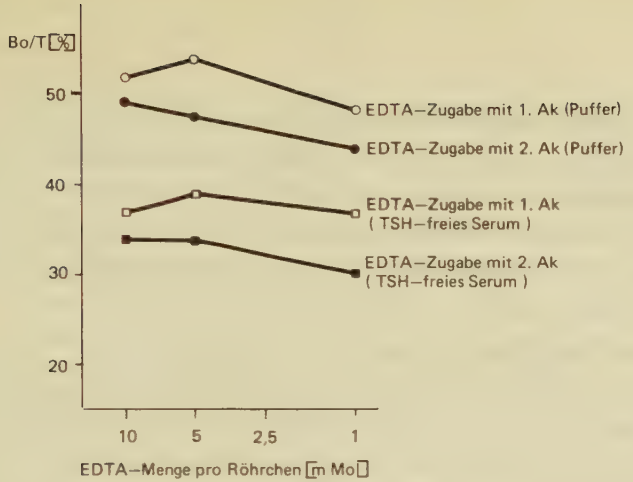


Abb.11: Abhängigkeit der antikörpergebundenen Aktivität von der EDTA-Konzentration unter verschiedenen Inkubationsbedingungen.

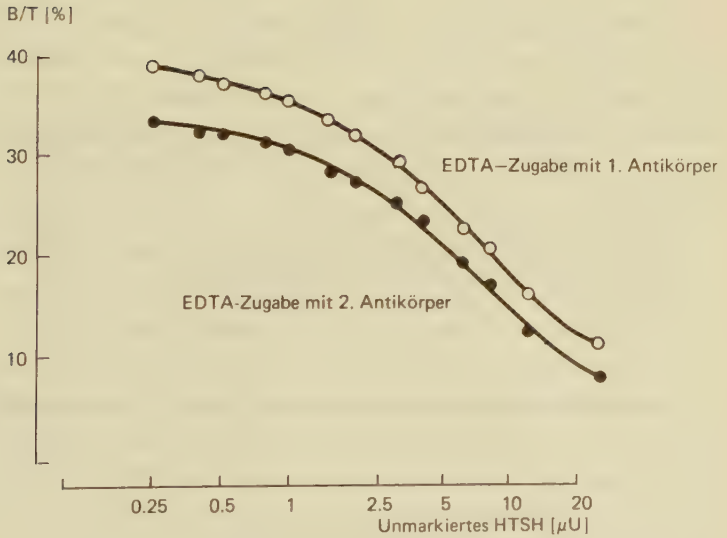


Abb.12: Standardkurven in TSH-freiem Serum bei zeitlich unterschiedlicher EDTA-Zugabe.

analysierten Faktor im menschlichen Serum verantwortlich. Beachtenswert ist weiterhin, daß bei Testung von Serumproben in einem heterologen System keine Bindungsabnahme festzustellen ist (65). Beispiele für derartige heterologe Systeme sind radioimmunologische Verfahren, in denen Human-TSH unter Ausnutzung seiner Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen Rinder- oder Schweine-TSH gemessen wird.

2. Als weitere Möglichkeit einer Beeinflussung der Doppelantikörper-Methode sind Kreuzreaktionen zwischen menschlichen Gammaglobulinen des Serums und dem 2. Antikörper zu nennen (39). Die Folge ist eine unvollständige Präzipitation der antikörpergebundenen Aktivität, da das Präzipitationsserum, teilweise von menschlichen Gammaglobulinen besetzt, für die eigentliche Fällungsreaktion nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stände. Es wird daher empfohlen (54), Präzipitationsserapräparationen nur von solchen Tieren zu verwenden, die zuvor noch nicht für Immunisierungsprozesse gegen menschliches Serum herangezogen wurden.

Eine weitere Möglichkeit zur Trennung der freien von der gebundenen Aktivität wurde auf ihre Anwendung für den TSH-Radioimmunoassay geprüft. Dieses Verfahren beruht auf der Fällung der gesamten Gammaglobuline durch eine alkoholische Ammoniumacetat-Lösung, wobei nicht antikörpergebundene Proteohormone in Lösung bleiben. Es wurde kürzlich bei der radioimmunologischen Bestimmung von LH und FSH erfolgreich angewandt (67). Der Vorteil der Methode beim LH- und FSH-Radioimmunoassay liegt in einer Erhöhung der Sensibilität sowie der Möglichkeit, mit sehr kleinen Serumvolumina zu arbeiten.

Um das Verfahren auf seine Anwendbarkeit für den TSH-Radioimmunoassay zu prüfen, wurde in Vorversuchen zunächst die prozentuale Zusammensetzung von Alkohol und Ammoniumacetat, mit der die optimale Fällung erzielt werden kann, ermittelt. Zwei Arten von Proben wurden in mehrfacher Ausführung angesetzt. Die erste enthielt kein unmarkiertes Hormon und stellte bei einem Antikörperüberschuß von 1:3000 pro 100 µl Pipettiervolumen (Endverdünnung 1:6600) die maximal zu bindende Aktivität dar. Mit der zweiten, die

nur markiertes Hormon und keinen Antikörper beinhaltete, wurde die unspezifische Präzipitation, auch Blank genannt, gemessen. Nach der üblichen Assaydurchführung, wobei die Substanzen allerdings in wesentlich geringeren Mengen pro Röhrchen angesetzt wurden (Endvolumen 220 µl), erfolgte die Zugabe des Fällungsmittels jeweils in einer Zusammensetzung mit steigender Alkoholkonzentration. Wie das Ergebnis in Abb. 13 zeigt, ist der Abstand zwischen den B_0/T-Werten bei Überschuß und Abwesenheit (Blank) von Anti-HTSH über den gesamten Bereich steigender Alkoholkonzentrationen sehr schmal. Eine Voraussetzung dieser Trennungsmethode ist eine genügend große Differenz zwischen Blank und maximal zu bindender Aktivität. Eine Alkoholkonzentration, bei der diese Bedingungen erfüllt wären, konnte nicht ermittelt werden, so daß auf die weitere Durchführung der Trennungsmethode verzichtet wurde. Da es sich hierbei nur um orientierende Vorversuche handelte, bleibt die Ursache, warum diese Methode insbesondere bei der Strukturähnlichkeit der LH- und TSH-Moleküle nicht auf den TSH-Radioimmunoassay übertragbar ist, ungeklärt.

3.1.6. Präzision, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Wiederfindung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit der radioimmunologischen Bestimmungsmethode wurde mit Hilfe mehrerer statistischer Kontrolldaten geprüft. Durch sie wird nicht nur eine Aussage über die Güte und Genauigkeit jedes einzelnen Ansatzes, sondern auch über die Vergleichbarkeit der in verschiedenen Ansätzen ermittelten Konzentrationswerte ermöglicht. Zur Qualitätskontrolle wurden die folgenden Parameter herangezogen: Präzision, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Wiederfindung.

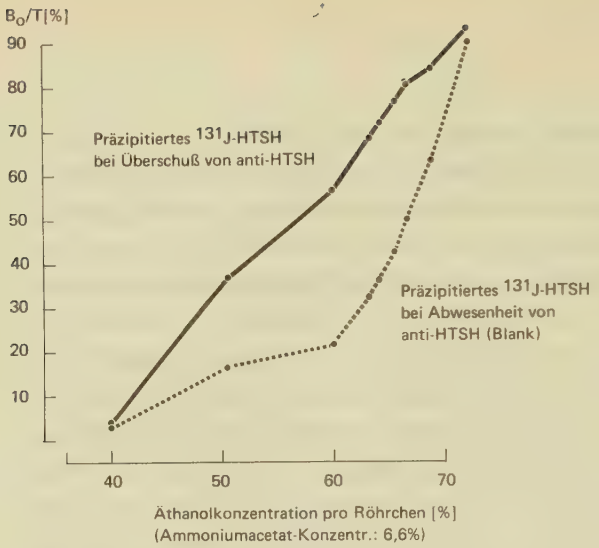


Abb.13: Vergleich von unspezifisch präzipitierter und antikörpergebundener Aktivität nach Fällung mit Äthanol/Ammoniumacetat.

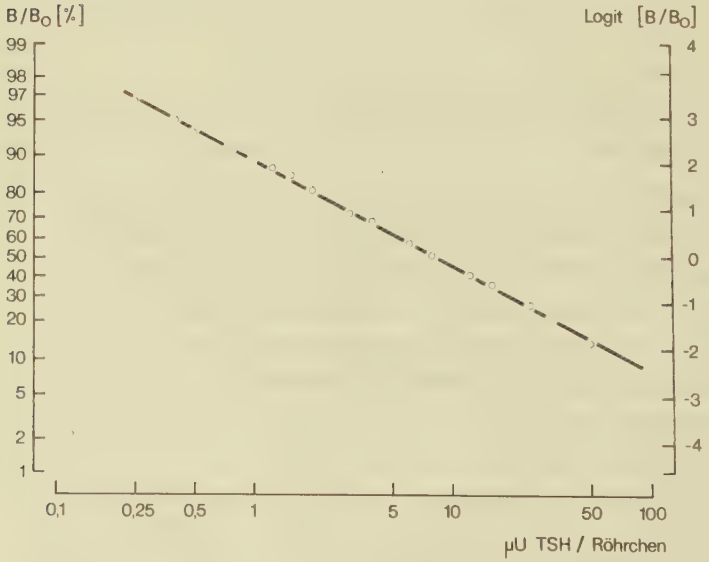


Abb.14: Linearisierte Standardkurve durch Auftragung von Logit B/B_o über log [HTSH].

Präzision: Die Präzision radioimmunologischer Bestimmungsmethoden läßt sich in Form des Präzisionsindex λ angeben, der sich bei Bezug auf die Standardkurve als der Quotient aus der Standardabweichung S_b aller Einzelmeßwerte und der Steigung b der Regressionsgeraden ergibt ($\lambda = S_b/b$) (68). Bei alleiniger Betrachtung der Steigung gibt deren Wert ein Maß für das Auflösungsvermögen der Standardkurve an. D.h., je steiler eine Kurve verläuft, umso geringere Differenzen der Hormonkonzentrationen können aus der Kurve unterschieden werden.

Zur Ermittlung der den Präzisionsindex bestimmenden Komponenten muß die Standardkurve zuvor linearisiert werden. Eine Linearisierung läßt sich auf zwei Arten erreichen. Einmal nach der Methode von HALES und RANDLE (39), bei der die gebundene Aktivität durch B_o/B ausgedrückt (s. Kap. 1.2.) auf der y-Achse und die Menge an zugegebenem unmarkierten Hormon in einem linearen Maßstab auf der x-Achse abgetragen wird. Als zweite Möglichkeit bietet sich das von RODBARD et al. (69, 70) vorgeschlagene Logit-Verfahren an, bei dem die gebundene Aktivität ($B/B_o \times 100$) in Logit-Einheiten umgerechnet und auf der y-Achse aufgetragen wird, während das unmarkierte Hormon auf der x-Achse in einem logarithmischen Maßstab registriert wird (Abb. 14). Dieses Verfahren zeichnet sich vor allem durch einfache Anwendbarkeit und Genauigkeit aus und wurde zur Ermittlung der für die Berechnung des Präzisionsindex notwendigen Daten angewandt. Neben den die Steigung der Geraden angebenden Regressionskoeffizienten b, dessen Standardabweichung S_b, dem aus diesen Werten sich ergebenden Präzisionsindex λ wurden des weiteren der Korrelationskoeffizient r und dessen Standardabweichung s_r berechnet.

Sämtliche Werte sind in Tabelle VI aufgeführt. Die Steigung der Regressionsgeraden schwankt in einem Bereich von -0.4907 bis -0.5978 um einen Mittelwert von -0.5482. Der mittlere Präzisionsindex λ beträgt 0.0215 mit einer Schwankungsbreite von 0.0098 - 0.0493 und liegt damit im Vergleich zu den von anderen Autoren (53, 71) für radioimmunologische TSH-Bestimmungen ermittelten Werten sehr gut.

Tabelle VI

Statistische Kontrolldaten der Präzision und Empfindlichkeit der radioimmunologischen TSH-Bestimmung.

TSH-Nr.	r	s_r	b	S_b	λ	"50%-Intercept" (µU/0.3 ml)
9	0.9979	0.0203	-0.5978	0.0121	0.0202	10
10	0.9981	0.0173	-0.5646	0.0098	0.0174	8.3
11	0.9951	0.0284	-0.5516	0.0157	0.0285	10.25
12	0.9834	0.0484	-0.5502	0.0271	0.0493	8.1
13	0.9972	0.0204	-0.5568	0.0113	0.0203	10
14	0.9972	0.0199	-0.5093	0.0101	0.0198	8.7
15	0.9945	0.0290	-0.5525	0.0161	0.0291	9
16	0.9946	0.0326	-0.5078	0.0116	0.0228	10.1
17	0.9957	0.0267	-0.5543	0.0148	0.0267	10.25
18	0.9979	0.0171	-0.5946	0.0102	0.0172	8.7
19	0.9978	0.0176	-0.5335	0.0094	0.0176	8.8
20	0.9993	0.0099	-0.5192	0.0051	0.0098	8.5
21	0.9963	0.0237	-0.5763	0.0137	0.0238	10
22	0.9961	0.0219	-0.5560	0.0122	0.0219	9
23	0.9980	0.0167	-0.5594	0.0093	0.0166	9.6
24	0.9983	0.0152	-0.5480	0.0083	0.0151	10
25	0.9967	0.0225	-0.5442	0.0122	0.0224	10.05
26	0.9978	0.0179	-0.5611	0.0101	0.018	9.4
27	0.9981	0.0160	-0.5481	0.0088	0.0161	9.8
28	0.9982	0.0171	-0.5358	0.0092	0.0172	7.2
29	0.9969	0.0213	-0.4907	0.0104	0.0212	10
Mittelwert	0.9964	0.0220	-0.5482	0.0171	0.0215	9.3

Empfindlichkeit: Der Begriff der Empfindlichkeit, auch als Sensibilität bezeichnet, wird in der Literatur nicht gleichlautend gebraucht. So definiert EKINS (72) die Empfindlichkeit als die untere Nachweisgrenze, während FINNEY (73) unter Sensibilität die Steilheit der Standardkurve versteht. Von RODBARD et al. (69) wird als Maß für die Empfindlichkeit eines gegebenen Radioimmunoassay die Hormonkonzentration angesehen, die sich aus der Standardkurve bei einem Wert von 50 % gebundener Aktivität, d.h. bei 1/2 B_o/T, ablesen läßt. Dieser als "50 %-Intercept" bezeichnete Wert wird in Zusammenhang mit der Steigung der Standardkurve zur Überprüfung der Empfindlichkeit verwendet.

Diese zuletzt angegebene Methode scheint sich am ehesten zu einer Qualitätskontrolle des Radioimmunoassay zu eignen. Durch die Bestimmung der Hormonkonzentration bei 50 % gebundener Aktivität wird die Lage der Eichkurve im Koordinatensystem definiert. Aus der letzten Spalte in Tabelle VI ergibt sich für den "50 %-Intercept" aus 21 Ansätzen ein Mittelwert von 9.3 µU TSH/Röhrchen bei einem Bereich von 7.2 - 10.25 µU TSH. TSH-Spiegel, die von diesem Mittelwert nach oben bzw. unten abweichen, zeigen eine nach rechts bzw. links verschobenen Standardkurve an. Betrachtet man eine Reihe radioimmunologischer Ansätze, dann verringert sich bei einer als konstant angenommenen Steigung der Standardkurven die Empfindlichkeit mit einer Zunahme des "50 %-Intercept". Die Steigung verdeutlicht zusätzlich - wie schon erläutert - die Ablesegenauigkeit der TSH-Werte von der Standardkurve. Durch die Kombination des "50 %-Intercept" und der Steigung ist die Standardkurve in ihrem Verlauf ausreichend beschrieben und zur Empfindlichkeitskontrolle sehr gut geeignet. Vorteile dieser Methode gegenüber der von EKINS gebrauchten Definition von Sensibilität sind darin zu sehen, daß der "50 %-Intercept" in einem relativ konstanten Kurvenabschnitt liegt, während die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze aufgrund der starken Schwankungen der Eichkurve in diesem Bereich auf Schwierigkeiten stößt. Da es bisher allgemein üblich war, diesen Wert zur Festlegung der unteren Grenze des Meßbereiches anzugeben, wurde er auch für diesen Radioimmunoassay ermittelt. Er lag in einem Bereich von 0.8 - 1.2 µU TSH/ml Serum.

Reproduzierbarkeit: Unter der Reproduzierbarkeit eines radioimmunologischen Verfahrens versteht man eine Angabe über die Übereinstimmung der Ergebnisse ein und derselben Probe bei ihrer wiederholten Bestimmung. Diese Angabe wird in Prozent der Abweichung vom Mittelwert, der sich aus den Wiederholungsbestimmungen der Probe ergibt, ausgedrückt und als Variationskoeffizient (VK) bezeichnet. Hierbei muß zwischen der Reproduzierbarkeit der Mehrfachbestimmung einer Probe innerhalb eines Ansatzes (Intraassay-Reproduzierbarkeit) und von Ansatz zu Ansatz (Interassay-Reproduzierbarkeit) unterschieden werden.

Die Intraassay-Reproduzierbarkeit (Tabelle VII) bei 18facher Bestimmung eines Normalserums betrug 4±0.35 µU TSH/ml mit einem Variationskoeffizienten von 8.7 %. Ermittelt man den Variationskoeffizienten nicht aus den TSH-

Tabelle VII

Reproduzierbarkeit der radioimmunologischen TSH-Bestimmung.

	Anzahl der Bestimmungen bzw. Ansätze	Mittl. TSH-Konz. ± SD (µU/ml)	Variationskoeffizient (%)
Intraassay-Reproduzierbarkeit	18	4.0 ± 0.35	8.7
Interassay-Reproduzierbarkeit			
Kontrollserum 1	21	3.5 ± 0.48	13.8
Kontrollserum 2	21	6.8 ± 1.26	18.5
Kontrollserum 3	21	70.0 ± 7.2	10.3

Werten, sondern aus ihren entsprechenden prozentualen Bindungswerten, so beträgt er 1.35 %. Die 6fach schlechtere Übereinstimmung der Intraassay-Reproduzierbarkeit der TSH-Werte bei Vergleich mit ihren entsprechenden Bindungswerten ist durch den Standardkurvenverlauf bedingt, der in dem unteren TSH-Bereich keinen linearen Verlauf mehr aufweist und so die Verzerrung der Ergebnisse hervorruft.

Der anhand der Kontrollseren bestimmte Variationskoeffizient der Interassay-Reproduzierbarkeit (Tabelle VII) lag für Kontrollserum 1 mit einem mittleren TSH-Gehalt von 3.5 µU/ml bei 13.8 %. Kontrollserum 2 wies bei einer mittleren TSH-Konzentration von 6.8 µU/ml einen Variationskoeffizienten von 18.5 % und Kontrollserum 3 bei einem mittleren TSH-Wert von 70 µU/ml einen solchen von 10.3 % auf.

Diese Ergebnisse stimmen mit den von anderen Autoren ermittelten Werten überein (52, 53).

Wiederfindung: Unter Wiederfindung, auch als Recovery bezeichnet, versteht man eine Qualitätsangabe, die aussagt, mit welcher Genauigkeit vorgegebene TSH-Konzentrationen mit Hilfe des erstellten Testverfahrens bestimmt werden können. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden einem Serum mit normalem TSH-Spiegel bekannte TSH-Mengen von 0.44 bis 16 µU pro Röhrchen zugesetzt. Nach der experimentellen Ermittlung der TSH-Werte wurden diese mit den entsprechenden errechneten TSH-Konzentrationen verglichen. Die für den beschriebenen TSH-Radioimmunoassay sich ergebenden Werte der Wiederfindung sind in Tabelle VIII aufgeführt. Der Mittelwert der Wiederfindung betrug 99.1 % (91.3 - 104.4 %).

Tabelle VIII

Wiederfindungs-Versuche im TSH-Radioimmunoassay.

	Zugegebene TSH-Konzentration (µU)	TSH-Konzentr. experimentell (µU/0.3 ml)	TSH-Konzentr. errechnet (µU/0.3 ml)	Wiederfin (%)
Normalserum	-	1.15	1.15	100*
	0.44	1.6	1.59	100.
	0.78	1.78	1.93	99.
	1.0	2.03	2.15	94.
	1.56	2.83	2.71	104.
	2.0	3.15	3.15	100
	4.0	4.70	5.15	91.
	8.0	9.4	9.15	102.
	16.0	17.2	17.15	100.

*Per Definitionem gleich 100.

3.2. Klinische Anwendung

Vor der Beantwortung der medizinischen Fragestellung wurde der TSH-Normalbereich des erstellten Radioimmunoassay ermittelt. Es schlossen sich Untersuchungen an athyreoten Patienten an, deren Schilddrüse aufgrund neoplastischer Veränderungen reseziert worden war, und bei denen zwecks Metastasensuche in halbjährlichen Abständen Kontrollszintigraphien durchgeführt wurden. Während der hierfür nötigen Unterbrechung der Schilddrüsenhormonsubstitution wurde der TSH-Anstieg ermittelt. Die Resubstitution erfolgte unter zusätzlicher Beachtung weiterer Schilddrüsenparameter wie dem Trijodthyronin-Bindungs-Index (TBI), dem Gesamtthyroxin und der Bestimmung des protein-gebundenen Jods (PBJ).

3.2.1. Normalwerte

Die Ermittlung von Normalwerten, die die absolute TSH-Konzentration im Serum wiedergeben, ist mit den bisher angewandten Verfahren nicht möglich. Die gemessenen Normalkonzentrationen für euthyreote Personen hängen in gewissen Grenzen von der benutzten radioimmunologischen Technik ab. TSH-Normalbereiche müssen deshalb unter den gegebenen Versuchsbedingungen von jedem Labor an einem größeren Kollektiv selbst ermittelt werden. Während die Abgrenzung des Normalbereiches gegen Hypothyreosen mit erhöhten TSH-Werten keine Schwierigkeit bereitet, ist auf der anderen Seite eine Trennung zu den hyperthyreoten Schilddrüsenerkrankungen aufgrund mangelnder Empfindlichkeit des Verfahrens noch nicht gelungen. Ein Vergleich unter den von verschiedenen Autoren (50-52, 60, 61, 71) ermittelten Normalwerten ist nur mit Einschränkungen möglich, da die Assay-Durchführungen noch nicht standardisiert sind und von verschiedenen Faktoren wie der Reinheit des Hormons, der spezifischen Aktivität und immunchemischen Kompetenz des markierten Hormons und den Eigenschaften des Antikörpers abhängig sind, um nur einige zu nennen.

Die Normalwerte des hier beschriebenen Radioimmunoassay wurden anhand eines schilddrüsengesunden Kollektivs von 78 Normalpersonen, 50 (64 %)

Frauen und 28 (36 %) Männern, ermittelt. Bei 45 (58 %) Personen waren TSH-Spiegel nachzuweisen, während sie bei den restlichen 33 Personen unterhalb der Sensibilitätsschwelle des Verfahrens lagen. Von den 50 Frauen waren bei 31 (62 %) TSH-Spiegel einer Größenordnung von 3.3 ± 1.6 µU/ml Serum (Mittelwert ± Standardabweichung) meßbar. Beim Kollektiv der männlichen Normalpersonen konnte bei 14 (50 %) der 28 Untersuchten TSH-Konzentrationen von 2.7 ± 1.5 µU/ml Serum ermittelt werden. Da kein signifikanter Unterschied in den TSH-Spiegeln zwischen den weiblichen und männlichen Normalpersonen festzustellen war, ergab sich aus den nachweisbaren TSH-Werten ein Mittelwert von 3.1 ± 1.6 µU/ml Serum. Der Bereich für euthyreote Personen liegt zwischen nicht nachweisbar (<0.8 µU/ml) und 6.5 µU/ml Serum.

Mit den ermittelten Normalwerten liegt das Testverfahren in einem Bereich, der auch von anderen Autoren, die mit denselben Referenzsubstanzen gearbeitet haben, angegeben wird (50-52). HALL et al. (61) berichten zwar über eine deutliche Sensibilitätssteigerung in ihrem TSH-Assay, jedoch verwendeten sie dabei ein Meerschweinchen-anti-HTSH höherer Spezifität und Bindungskraft als das von den meisten anderen Autoren benutzte Kaninchen-anti-HTSH. Bei Verwendung des Kaninchen-anti-HTSH lagen ihre Werte mit 4.8 µU/ml Serum ebenfalls in dem auch mit diesem Radioimmunoassay ermittelten Bereich (74).

3.2.2. TSH-Anstieg nach Unterbrechung der Schilddrüsenhormonsubstitution

Patienten, die aufgrund eines Schilddrüsenkarzinoms totalthyreodektomiert worden sind, werden auf der Suche nach Metastasen halbjährlichen Kontrollszintigraphien unterzogen. Um in eventuellen Metastasen eine genügende Radiojodanreicherung zu erzielen, werden hohe TSH-Spiegel benötigt. Diese können auf verschiedene Arten erreicht werden. Eine Methode bedient sich der intramuskulären Injektion von Rinder-TSH (75-77), das dieselbe biologische Aktivität, aber unterschiedliche immunologische Eigenschaften besitzt. Der Vorteil der Stimulierung mit exogenem TSH besteht darin, daß die Be-

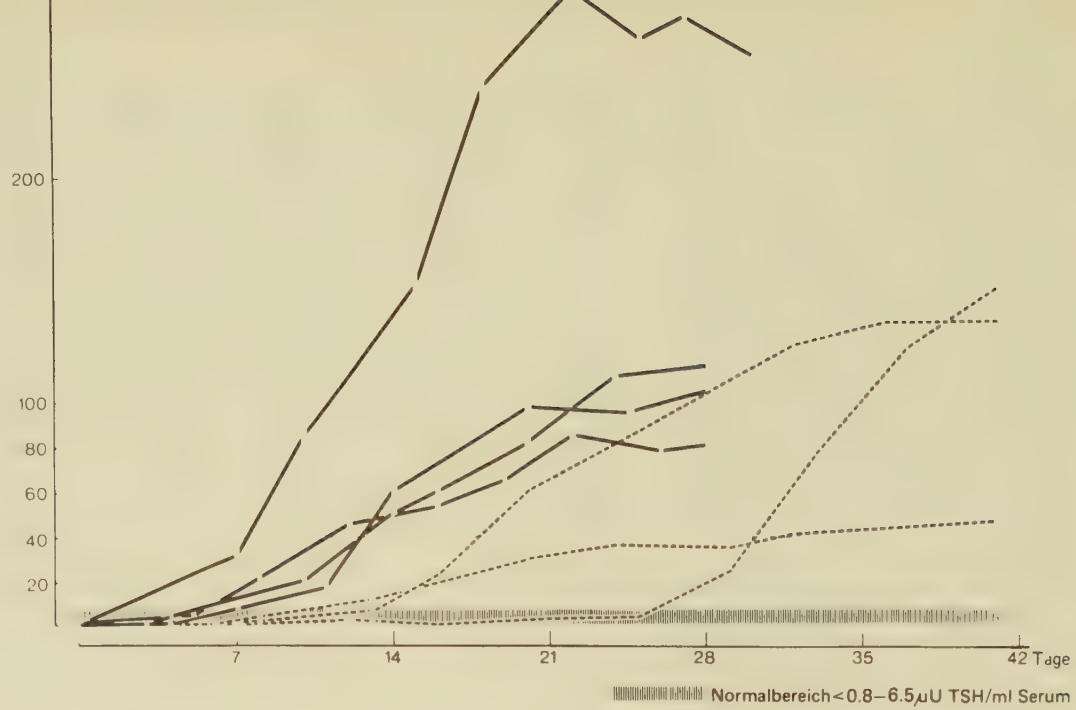


Abb.15: TSH-Spiegel im Serum bei total thyreodektomierten Patienten.
——— nach Absetzen von T_3-Medikation (100 µg/d)
------- nach Absetzen von T_4-Medikation (300 µg/d)

handlung mit Schilddrüsenhormonen nicht unterbrochen zu werden braucht (78). Nachteile sind in den nach wiederholten Injektionen auftretenden lokalen Reaktionen (79) und in der Bildung von Antikörpern (80) zu sehen. Als zweite Möglichkeit bietet sich an, durch Absetzen der Schilddrüsenhormonsubstitution erhöhte endogene TSH-Spiegel zur Stimulation von Schilddrüsengewebe zu erreichen. Bei dieser Methode muß jedoch in Kauf genommen werden, daß die Patienten oft in einen ausgeprägten hypothyreoten Zustand geraten, insbesondere wenn zur Erlangung einer genügenden TSH-Stimulation eine Medikationspause von 6 Wochen als notwendig erachtet wird (81). Als Kombination der endogenen und exogenen Stimulation wird heute häufig nach Absetzen der Hormonbehandlung Rinder-TSH vor der Durchführung des Szintigramms appliziert (77). Von Versuchen, die TSH-Sekretion durch Gaben von TRH zu stimulieren, ist berichtet worden (82).

Der bei der endogenen TSH-Stimulation durch Absetzen der Hormonsubstitution veranschlagte Zeitraum von 6 Wochen ist ein Sicherheitsmaß. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der TSH-Bestimmung untersucht, ob ein derartig langer Zeitraum zur Erzielung ausreichender TSH-Spiegel gerechtfertigt ist, und inwieweit dieser von der Art der vorherigen Hormonmedikation abhängig ist.

Es handelte sich bei den untersuchten Personen um 7 Patientinnen, die totalthyreodektomiert und mit Radiojod nachbestrahlt worden waren. Vier der Patientinnen hatten eine Substitutionsdosis von 100 µg L-Trijodthyronin (T_3) pro Tag, drei eine von 300 µg L-Thyroxin (T_4) pro Tag eingenommen. TSH-Spiegel von mindestens 40 µU pro Milliliter Serum wurden angestrebt, da ausgeprägte Hypothyreosen Werte über 40 µU/ml Serum aufzuweisen pflegen und andererseits bei einer der hier untersuchten Patientinnen diese Grenze nicht wesentlich überschritten wurde. Die TSH-Spiegel der T_3-substituierten Patientinnen (Abb. 15) lagen bereits nach 7 Tagen über dem Normalbereich, nach 14 Tagen über der Grenze von 40 µU/ml. Nach 3 Wochen wiesen die Werte aller Patientinnen annähernd ein Plateau auf. Die dabei erzielten TSH-Werte lagen zwischen 78.3 und 293.3 µU/ml Serum. Diese Werte stehen in Übereinstimmung mit den von HERSHMAN et al. (83) ermittelten Ergebnissen,

die während der Arbeit an dieser Dissertation veröffentlicht wurden. Sie konnten ebenfalls den schnellen TSH-Anstieg nach Absetzen von der T_3-Medikation beobachten. Bei den von diesen Autoren untersuchten 10 Patienten konnte jedoch nur bei zweien eine Plateaubildung festgestellt werden, was wahrscheinlich auf die kurze Untersuchungszeit von maximal 20 Tagen zurückzuführen ist.

Wie wegen der starken Thyroxinaffinität des Thyroxin-bindenden-Globulins (TBG) zu erwarten, wurde bei den T_4-substituierten Patientinnen ein langsamerer TSH-Anstieg beobachtet (Abb. 15). Bei einer Patientin konnte erst in der 3. Woche ein Ansteigen über den Normalbereich festgestellt werden. In der 5. Woche lagen sämtliche TSH-Spiegel über 40 µU/ml, wobei allerdings bei einer Patientin selbst nach 6 Wochen der TSH-Wert 46.7 µU/ml nicht überschritt, während bei den beiden anderen die Werte auf 126.7 bzw. 136.6 µU/ml Serum stiegen. Zwei Patientinnen erreichten ein Plateau in der 5. Woche.

3.2.3. Substitution mit L-Thyroxin

Nach der Durchführung der Kontrollszintigraphien erfolgte die Resubstitution mit L-Thyroxin. Neben den TSH-Konzentrationen und der klinischen Symptomatik wurden als weitere Parameter zur Abgrenzung zwischen hypothyreotem und euthyreotem Zustand der TBI, das Gesamtthyroxin und das PBJ herangezogen (Abb. 16/17). Die Substitutionsdosis der 7 Patientinnen wurde wöchentlich um 50 µg L-T_4 gesteigert. Die Ausgangswerte der TSH-Spiegel schwankten zwischen 26 und 305 µU/ml. Unter einer Substitutionsdosis von 100 µg L-T_4 pro die ist mit einer Ausnahme bei allen Patientinnen ein deutlicher Abfall der TSH-Werte festzustellen. Bei einer Applikation von 200 µg L-T_4/d befindet sich der TSH-Wert einer Patientin im Normalbereich, während die TSH-Spiegel der anderen zwischen 15-123 µU/ml Serum liegen. Bei 250 µg L-T_4/d ist bei drei Patientinnen der euthyreote Zustand erreicht. Zwei der restlichen vier Patientinnen zeigen bei dieser Dosierungshöhe einen erneuten TSH-Anstieg, was auf ein nicht konstantes Einhalten der Tabletteneinnahme

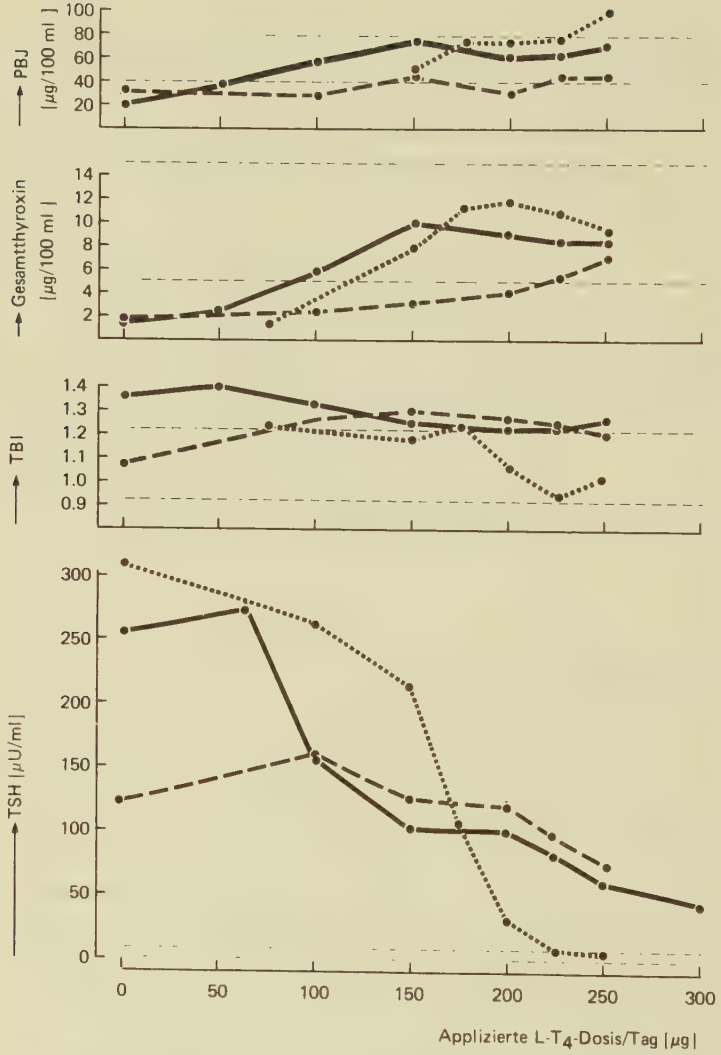


Abb.16: Substitution drei totalthyreodektomierter Patientinnen in schrittweiser Steigerung der L-T_4-Dosis um 50 µg/Woche. Die Einstellung auf einen euthyreoten Zustand wurde kontrolliert durch TSH-Spiegel, TBI-Wert, Gesamtthyroxin und PBJ. Normalbereiche innerhalb der gestrichelten Linien.

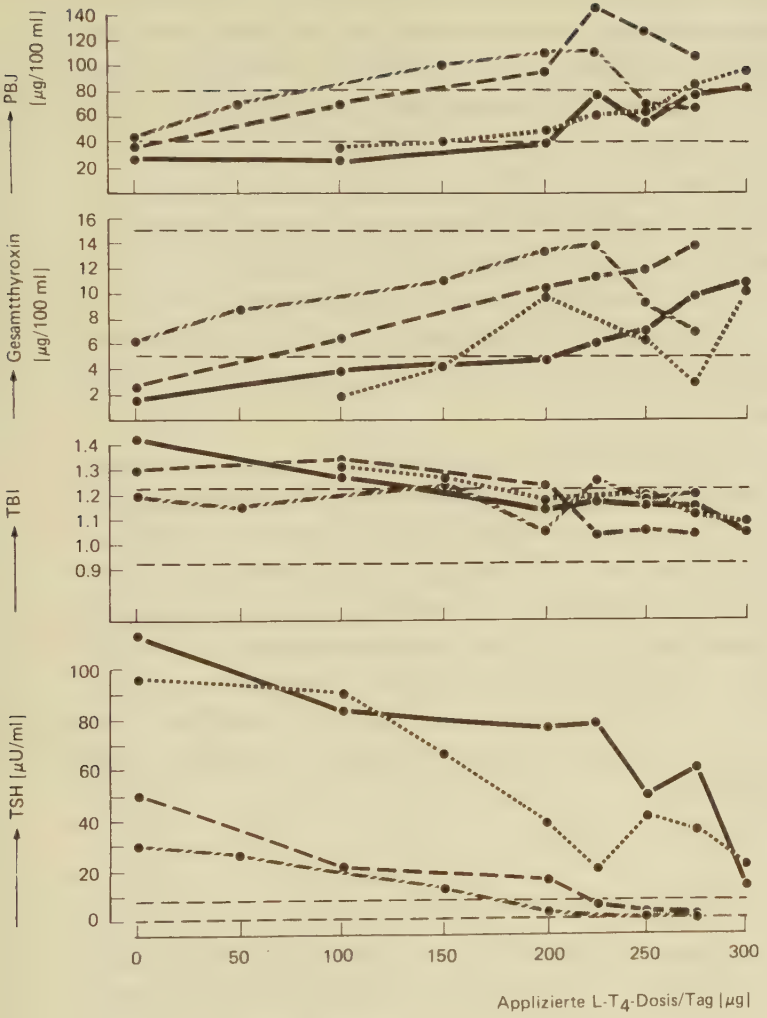


Abb.17: Substitution vier totalthyreodektomierter Patientinnen in schrittweiser Steigerung der L-T_4-Dosis um 50 µg/Woche. Die Einstellung auf einen euthyreoten Zustand wurde kontrolliert durch TSH-Spiegel, TBI-Wert, Gesamtthyroxin und PBJ. Normalbereiche innerhalb der gestrichelten Linien.

schließen lassen könnte. Da jedoch die TSH-Werte dieser vier Patientinnen in Bezug auf die Substitutionsdosis sämtlich recht hoch liegen, ist eine eventuelle Störung der Tablettenresorption zu diskutieren, insbesondere als über die Einstellung eines euthyreoten Zustandes mit maximal 200 µg L-T_4/d berichtet wurde (84).

In Übereinstimmung zu den TSH-Werten stand das klinische Bild. Von den fünf Patientinnen, die deutlich oberhalb des TSH-Normalbereiches lagen, waren vier von der klinischen Symptomatik her als eindeutig hypothyreot zu bezeichnen. Das Befinden derjenigen mit einem TSH-Spiegel von 12.7 µU/ml war klinisch leicht hypothyreot. Die normalen TSH-Werte der übrigen Patientinnen standen in Korrelation mit einem klinisch euthyreoten Zustand.

Im Gegensatz zu diesen Feststellungen standen die Ergebnisse der anderen Parameter. Der TBI-Wert zeigt im Mittel oberhalb einer L-T_4-Applikation von 172 (0-250) µg/d den euthyreoten Zustand an, während das Gesamtthyroxin im Mittel bei 100 (0-225) µg/d in den Normalbereich zurückkehrt. Das PBJ liegt oberhalb einer mittleren Dosis von 55 (0-218) µg/d im Normalbereich. Bei den mit diesen Parametern ermittelten L-T_4-Dosierungen befinden sich die entsprechenden TSH-Werte im hypothyreoten Bereich. In Bezug auf die Ungenauigkeit des Gesamtthyroxins als Indikator einer euthyreoten Stoffwechsellage konnten die Ergebnisse von COTTON et al. (84) bestätigt werden.

3.2.4. Schlußfolgerungen

Um hohe endogene TSH-Spiegel z.B. für Kontrollszintigraphien bei thyreodektomierten Patienten zu erzielen, sollte grundsätzlich vor Absetzen der Hormonmedikation auf eine T_3-Substitution umgestellt werden. Die Absetzphase vor Durchführung des Radiojodszintigramms kann dann auf 2-3 Wochen beschränkt werden, da nach 2 Wochen TSH-Spiegel über 40 µU/ml und nach 3 Wochen eine Plateaubildung zu erwarten ist. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß die Substitution hypothyreoter Patienten unter Beachtung der

TSH-Konzentrationen erfolgen sollte, da sie der einzige verläßliche Indikator einer optimalen Substitution mit Schilddrüsenhormonen sind. Daneben hat das klinische Bild noch am ehesten einen Aussagewert, wohingegen sämtliche anderen Teste als unzureichend anzusehen sind.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit behandelt den Aufbau einer Methode zur radioimmunologischen Bestimmung von TSH-Konzentrationen im menschlichen Serum. Der Einsatz des Verfahrens in der klinischen Diagnostik wird am Beispiel von Verlaufsuntersuchungen an thyreodektomierten Patienten beschrieben.

In methodischen Untersuchungen wurden die optimalen Bedingungen für die experimentelle Durchführung der TSH-Bestimmung ermittelt. Dabei ergaben sich folgende Standardbedingungen:
Die Markierung des Hormons erfolgte mit Jod-131 in einem Verhältnis von ca. 2.5 mCi Jod-131 und 5 µg TSH pro Markierungsansatz. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 310 - 431 mCi/mg TSH. Für die Durchführung der radioimmunologischen Reaktion wurden pro Ansatzröhrchen 42 - 64 pg ^{131}J-markiertes TSH eingesetzt. Das Anti-HTSH-Serum wurde in einer Endverdünnung von 1 : 180000 verwendet. Der Ansatz der Standardkurve, die sich über einen Bereich von 0.25 - 100 µU TSH erstreckte, erfolgte in TSH-freiem Humanserum. Dieses wurde von freiwilligen Versuchspersonen durch Suppression der TSH-Ausschüttung mit 150 µg T_3/d über 12 Tage gewonnen. Jedem Inkubationsröhrchen wurde zur Unterdrückung der Kreuzreaktivität des benutzten Antiserums 10 I.U. HCG zugegeben. Zur Vermeidung störender Komplementreaktionen des menschlichen Serums mit den übrigen Reaktionskomponenten erwies sich die Zugabe von 5 mMol EDTA pro Ansatzröhrchen als optimal. Zur Trennung von antikörpergebundenem und freiem Hormon wurde die Doppelantikörper-Methode angewandt.

Die untere Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei 0.8 - 1.2 µU TSH/ml Serum. Bei Reproduzierbarkeitsversuchen ergab sich ein Intraassay-Variationskoeffizient von 8.7 %. Der Interassay-Variationskoeffizient lag in den niedrigen Konzentrationsbereichen (um 3.5 und 6.8 µU/ml) bei 13.8 und 18.5 % und in den höheren (70 µU/ml) bei 10.3 %. Die Wiederfindung bekannter zugegebener TSH-Konzentrationen durch das ermittelte Bestimmungsverfahren betrug 99.1 % (91.3 - 104.4 %). TSH-Werte waren in einem Kollektiv von 78 Normalpersonen in 58 % der Fälle nachweisbar. Der Mittelwert der meß-

baren TSH-Konzentrationen dieses Normalkollektivs betrug 3.1 ± 1.6 µU/ml Serum in einem Bereich von <0.8 - 6.5 µU TSH/ml.

Bei 7 totalthyreodektomierten Patientinnen wurde der TSH-Anstieg nach Unterbrechung der Schilddrüsenhormonmedikation verfolgt. Die TSH-Werte der T_3-substituierten Patientinnen wiesen 3 Wochen nach Absetzen der Schilddrüsenhormone annähernd ein Plateau auf mit TSH-Spiegeln zwischen 78.3 - 293 µU/ml Serum. Die TSH-Werte von zwei der drei T_4-substituierten Patientinnen bildeten erst in der 6. Woche nach Hormonentzug ein Plateau mit Werten zwischen 126.7 und 136.6 µU TSH/ml. Der TSH-Spiegel der 3. Patientin hatte in der 6. Woche bei einem Wert von 46.7 µU/ml noch steigende Tendenz.

Bei der Substitution hypothyreoter Patienten erwiesen sich die TSH-Werte als guter Indikator einer euthyreoten Stoffwechsellage, während der Trijodthyronin-Bindungs-Index (TBI), das Gesamtthyroxin und das proteingebundene Jod (PBJ) in ihrer Genauigkeit zur Kontrolle des euthyreoten Zustandes unzureichend waren.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. PIERCE, J.G.
"The Subunits of Pituitary Thyrotropin-Their Relationship to Other Glykoprotein Hormones", Endocrinology 89 (1971) 1331-1344.

2. TAUROG, A., C.J.PORTER, D.T.THIO.
"Nature of the ^{131}I-Compounds Released Into the Thyroid Veins of Rabbits, Dogs, and Cats, Before and After TSH-Administration" Endocrinology 74 (1964) 902-913.

3. LAVER, W.G., V.M.TRIKOJUS.
"Complex Nature of the Proteolytic System of the Thyroid Gland" Biochem.Biophys.Acta 20 (1956) 444-445.

4. EKHOLM, R., U.STRANDBERG.
"Studies on Protein Synthesis in the Guinea Pig Thyroid" Ultrastruct.Res. 16 (1966) 181-196.

5. SCRANTON, J.R., W.TONG.
"Effects of TSH on Iodide Transport in Isolated Cells" Fed.Proc. 26 (1967) 643.

6. WILSON, B., E.RAGHUPATHY, T.TONOUE, W.TONG.
"TSH-Like Action of Dibutyryl-cAMP on Isolated Bovine Thyroid Cells", Endocrinology 83 (1968) 877-884.

7. TONG, W.
"Thyrotropin Stimulation of Thyroxine Synthesis in Isolated Thyroid Cells Treated with Puromycin" Endocrinology 76 (1965) 163-165.

8. JARRET, R.J., J.B.FIELD.
"A Comparison of the Effects of Thyrotrophin and Sodium Iodide of Glucose-1-^{14}C and the Levels of Triphosphopyridine Nucleotides in Thyroid Slices from Several Species" Endocrinology 75 (1964) 711-715.

9. BURKE, G.

"Comparison on Early Effects of Thyrotrophin and Long-Acting Thyroid-Stimulator on Thyroidal Phospholipogenesis" Endocrinology 83 (1968) 1210-1216.

10. HALL, R., J.TUBMEN.

"Further Studies on Effects of Thyroid-Stimulating Hormone on Thyroid Nucleotide Biosynthesis" J. Biol. Chem. 240 (1965) 3132-3135.

11. GILMAN, G.A., T.W.RALL.

"Studies on the Relation of Cyclic 3′,5′-AMP (CA) to TSH Action in Beef Thyroid Slices", Fed. Proc. 25 (1966) 617.

12. HOSKINS, R.G.

"The Thyroid-Pituitary Apparatus as A Servo (Feedback) Mechanism", J. Clin. Endocrinol. 9 (1949) 1429-1431.

13. GUILLEMIN, R.

"Hypothalamic Factor Releasing Pituitary Hormones" Recent Progr. Horm. Res. 20 (1964) 89-121.

14. HALL, R., L.AMOS, R.GARRY

"Thyroid Stimulating Hormone Response to Synthetic Thyrotropin-Releasing-Hormone in Man", Brit. Med. J. 2 (1970) 274-277.

15. SCHALLY, A.V., T.W.REDDING, C.Y.BOWERS, J.F.BARRETT.

"Isolation and Properties of Porcine Thyrotropin-Releasing-Hormone" J. Biol. Chem. 244 (1969) 4077-4088.

16. BURGUS, R., R.GUILLEMIN.

"Chemistry of Thyrotropin-Releasing Factor (TRF), Hypophysiotropic Hormones of the Hypothalamus: Assay and Chemistry" Hrsg.: J.Meites, Baltimore: Williams and Wilkins Company (1970) 227-241.

17. BOWERS, C.Y., A.V.SCHALLY, D.S.SCHALCH, C.GUAL, A.J.KASTIN, K.FOLKERS.

"Activity and Specifity of Synthetic Thyrotropin-Releasing-Hormone in Man", Biochem.Biophys. Res. Comm. 39 (1970) 352-355.

18. STUDER, R.O., H.STEINER.
"Hypothalamische Releasing Hormone"
Schweiz.Med.Wschr. 102 (1972) 1270-1275.

19. HERSHMAN, J.M., J.A.PITTMAN.
"Control of Thyrotropin Secretion in Man"
N.Engl. J. Med. 285 (1971) 997-1006.

20. YAMADA, T.
"The Effect of Electrical Ablation of the Nuclei Habenulae, Pineal Body and Subcommissural Organ on Endocrine Function with Reference to Thyroid Function"
Endocrinology 69 (1961) 706-711.

21. UTIGER, R.D.
"Thyrotrophin Radioimmunoassay: Another Test of Thyroid Function"
Ann.Intern.Med. 74 (1971) 627-629.

22. PITTMAN, J.A., E.D.HAIGLER, J.M.HERSHMAN, C.S.PITTMAN.
"Hypothalamic Hypothyroidism"
N.Engl.J.Med. 285 (1971) 844-845.

23. SHENKMAN, L., T.MITSUMA, A.SUPHAVAI, C.S.HOLLANDER.
"Hypothalamic Hypothyroidism"
JAMA 222 (1972) 480-481.

24. SNYDER, P.J., R.D.UTIGER.
"Repetitive Administration of Thyrotropin-Releasing Hormone. Results in Small Elevations of Serum Thyroid Hormones and in Marked Inhibition of Thyrotropin Response"
J. Clin. Invest. 25 (1973) 2305-2312.

25. BASTENIE, P.A., L.VANHAELST, P.NEVE.
"Coronary-Artery Disease in Hypothyroidism"
Lancet 1967, 2, 1221-1222.

26. FOWLER, P.B.S., J.SWALE.
"Premyxoedema and Coronary-Artery Disease"
Lancet 1967, 1, 1077-1079.

27. FOWLER, P.B.S., J.SWALE.
"Hypercholesterolaemia in Boderline Hypothyroidism"
Lancet 1970, 488-491.

28. ODELL, W.D., J.F.WILBER, W.E.PAUL.
"Radioimmunoassay of Thyrotropin in Human Serum"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 25 (1965) 1179-1188.

29. UTIGER, R.D.
"Radioimmunoassay of Human Plasma Thyrotropin"
J. Clin. Invest. 44 (1965) 1277-1286.

30. ADAMS, D.D., T.H.KENNEDY, R.D.UTIGER.
"Comparison of Bioassay and Immunoassay Measurements of Serum Thyrotropin (TSH) and Study of Levels by Immunoassay of Serum Concentrates", J. Clin. Endocrinol. Metab. 34 (1972) 1074-1079.

31. BONNYNS, M., L.VANHAELST, J.GOLSTEIN-GOLAIRE.
"Correlation Between Radioimmunological and Biological Human Thyrotropin Measurements"
Horm. Metab. Res. 3 (1971) 409-414.

32. KIRKHAM, K.E., W.M.HUNTER, F.H.JEFFERY, J.G.BENNIE.
"Measurement of Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) in Vitro"
In Vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine.
Proc. Symp. Vienna, 1969. Wien: IAEA (1970) 597-611.

33. YARLOW, R.S., S.A.BERSON.
"Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man"
J. Clin. Invest. 39 (1960) 1157-1175.

34. GRODSKY, G.M., P.H.FORSHAM.
"An Immunchemical Assay of Totale Extractable Insulin in Man"
J. Clin. Invest. 39 (1960) 1070-1079.

35. HERBERT, J., K.-S.LAU, C.W.GOTTLIEB, S.J.BLEICHER.
"Coated Charcoal Immunoassay of Insulin"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 25 (1965) 1375-1384.

36. MEADE, R.C., H.M. KLITGAARD.
"A Simplified Method for Radioimmunoassay of Human Serum Insulin"
J. Nucl. Med. 3 (1962) 407-416.

37. HUNTER, W.M., F.C. GREENWOOD.
"A Radio-immunelectrophoretic Assay for Human Growth Hormone"
Biochem. J. 91 (1964) 43-56.

38. FITSCHEN, W.
"A Quantitative Study of Antigen-Antibody Combination during Disk Electrophoresis in Acrylamide Gel using Iodine-131 Labelled Human Growth Hormone", Immunology 7 (1964) 307-315.

39. HALES, C.N., P.J. RANDLE.
"Immunoassay of Insulin with Insulin-Antibody Precipitate"
Biochem. J. 88 (1963) 137-146.

40. UTIGER, R.D., M.L. PARKER, W.H. DAUGHADAY.
"Studies on Human Growth Hormone. A Radioimmunoassay for Human Growth Hormone"
J. Clin. Invest. 41 (1962) 254-261.

41. FELBER, J.P.
"ACTH Antibodies and their Use for a Radioimmunoassay for ACTH"
Experienta 19 (1963) 227-229.

42. WILDE, C.E., A.H. ORR, K.D. BAGSHAWE.
"A Radioimmunoassay for Human Chorionic Gonadotropin"
Nature 205 (1965) 191-192.

43. ODELL, W.D., G.T. ROSS, P.L. RAYFORD.
"Radioimmunoassay for Human Luteinizing Hormone"
Metabolism 15 (1966) 287-289.

44. WOLF, A.
"Immunological Determination of Human Follicle Stimulating Hormone", Nature 211 (1966) 942-943.

45. ROTH, J., S.M.GLICK, L.A.KLEIN, M.J.PETERSON.
"Specific Antibody to Vasopressin in Man"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 26 (1966) 671-675.

46. GILLILAND, P.F., T.E.PROUT.
"Immunologic Studies of Octapeptides"
Metabolism 14 (1965) 912-917 und 918-923.

47. CONDLIFFE, P.G., R.W.BATES.
"Chromatography of Thyroid-Stimulating Hormone on Carboxymethylcellulose", J. Biolog. Chem. 223 (1956) 843-852.

48. GREENWOOD, F.C., W.M.HUNTER, J.S.GLOVER.
"The Preparation of ^{131}I-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity", Biochem. J. 89 (1963) 114-123.

49. RODBARD, D., H.J.RUDER, J.VAITUKAITIS, H.S.JACOBS.
"Mathematical Analysis of Kinetics of Radioligand Assay: Improved Sensitivity Obtained by Delayed Addition of Labelled Ligand", J. Clin. Endocrinol. 33 (1971) 343-355.

50. HERSHMAN, J.M., J.A.PITTMAN.
"Utility of the Radioimmunoassay of Serum Thyrotrophin in Man"
Ann. Intern. Med. 74 (1971) 481-490.

51. ODELL, W.D., R.D.UTIGER, J.F.WILBER, P.G.CONDLIFFE.
"Estimation of the Secretion Rate of Thyrotropin in Man"
J. Clin. Invest. 46 (1967) 953-959.

52. MAYBERRY, W.E., H.GHARIB, J.M.BILSTAD, G.W.SIZEMORE.
"Radioimmunoassay for Human Thyrotrophin"
Ann. Intern. Med. 74 (1971) 471-480.

53. MÜHLEN, A. von zur, D.EMRICH.
"Zur Methodik der radioimmunchemischen Bestimmung von menschlichem thyreotropen Hormon (HTSH)"
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9 (1971) 257-265.

54. FRANCHIMONT, P.
"TSH Radioimmunoassay"
In: Frontiers Hormone Research, Vol. 1, Basel: S. Karger (1972) 22-36.

55. VIVIAN, S.R., F.R. LaBELLA.
"Classic Bioassay Statistical Procedure Applied to Radioimmunoassay of Bovine Thyrotropin, Growth Hormone and Prolactin"
J. Clin. Endocrinol. 33 (1971) 225-233.

56. MÜHLEN, A. von zur, D. EMRICH.
"Radioimmunoassay of Human TSH with Two Different Systems"
In Vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine.
Proc. Symp. Vienna 1969. Wien: IAEA (1970) 585-595.

57. MÜHLEN, A. von zur.
In: Radioimmunoassay Methods, Hrsg.: Kirkham, K.E., and Hunter, W.M., Edinburgh: Churchill Livingstone (1971) 82-86.

58. QUABBE, H.J.
"Radioimmunologische Bestimmung von Wachstumhormon im Plasma des Menschen", Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7 (1969) 259-268.

59. WENZEL, K.W., H. MEINHOLD.
Unveröffentlichte Ergebnisse.

60. PATEL, Y.C., H.G. BURGER, B. HUDSON.
"Radioimmunoassay of Serum Thyrotropin: Sensitivity and Specifity"
J. Clin. Endocrinol. 33 (1971) 768-774.

61. HALL, R., J. AMOS, B.J. ORMSTON.
"Radioimmunoassay of Human Serum Thyrotrophin"
Brit. Med. J. 1 (1971) 582-585.

62. BERSON, S.A., R.S. YALOW, A. BAUMAN, M.A. ROTHSCHILD, K. NEWERLY.
"Insulin-I^{131} Metabolism in Human Subject: Demonstration of Insulin Binding Globulin in the Circulation of Insulin Treated Subjects", J. Clin. Invest. 35 (1956) 170-190.

63. MELANI, F., K.M. BARTELT, R. CONRADS, E.F. PFEIFFER.
"Die Jod-131-Markierung von Insulin, ACTH und STH mit hoher spezifischer Aktivität zur Anwendung in der radioimmunologischen Methode", Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 4 (1966) 189-195.

64. ODELL, W.D., J.F. WILBER, R.D. UTIGER.
"Studies of Thyrotropin Physiology by Means of Radioimmunoassay" Recent Progr. Horm. Res. 23 (1967) 47-85.

65. LEMARCHAND-BERAUD, T.
"Comparison Between Antibodies to Bovine and Human Thyrotrophin (TSH) for Radioimmunoassay in Plasma: Cross Reaction Studies with Clinical Results", Acta Endocrinol. 64 (1970) 610-629.

66. MORGAN, C.R., R.L. SORENSON, A. LAZAROW.
"Further Studies of an Inhibitor of the Two Antibody Immunoassay Systems", Diabetes 13 (1964) 579-584.

67. RÖMMLER, A., B.B. SAXENA.
"Separation of Antibody-Bound and Free Human Follicle-Stimulating and Luteinizing Hormones by Ethanol-Ammonium Acetate" Acta Endocrinol. 72 (1972) 643-653.

68. AUBERT, M.L.
"Critical Study of the Radioimmunological Assay for the Dosage of the Polypeptide Hormones in Plasma"
J. Nucl. Biol. Med. 1 (1970) 14-20.

69. RODBARD, D., P.L. RAYFORD, J.A. COOPER, G.T. ROSS.
"Statistical Quality Control of Radioimmunoassay"
J. Clin. Endocrinol. 28 (1968) 1412-1418.

70. RODBARD, D., P.L. RAYFORD, G.T. ROSS.
"Statistical Quality Control of Radioimmunoassay"
In: Statisticals in Endocrinology, Hrsg.: McArthur and Colton, Cambridge: The Mit Press (1970) 411-429.

71. LEMARCHAND-BÉRAUD, TH., A. VANNOTTI.
"Radioimmunoassay of Human Plasma TSH"
In: Current Topics in Thyroid Research, Hrsg.: C. Cassano, Proc. 5th International Thyroid Congress, Roma 1965. New York: Academic Press (1965) 527-541.

72. EKINS, R.P.
"Theoretical Aspects of Saturation Analysis"
In Vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine Proc. Symp. Vienna. Wien: IAEA (1970) 325-353.

73. FINNEY, D.J.
"Statistical Methods in Biological Assay"
Hrsg.: Griffin, 2. Auflage, London (1964).

74. HALL, R., J. TUBMEN, R. GARRY.
"Problems of TSH Immunoassay"
Clin. Sci. 38 (1970) 18P.

75. BLAHD, W.H., R.A. NORDYKE, F.K. BAUER.
"Radioactive Iodine (J^{131}) in the Postoperative Treatment of Thyroid Cancer", Cancer 13 (1960) 745-756.

76. CATZ, B., D.W. PETTIT, H. SCHWARTZ, D.F. McCAMMON, P. STARR.
"Treatment of Cancer of the Thyroid postoperatively with Suppressive Thyroid Medication, Radioactive Iodine, and Thyroid-Stimulating Hormone", Cancer 12 (1959) 371-383.

77. SMITHERS, D.W., N. HOWARD, N.G. TROTT.
"Treatment of Carcinoma of the Thyroid with Radioiodine"
Brit. Med. J. 2 (1965) 969-974.

78. POCHIN, E.E.
"Radioiodine Therapy"
In: The Thyroid, Hrsg.: Werner, S.C. and Ingbar, S.H., 3. Auflage, New York: Harper and Row (1971) 467-475.

79. TAUNTON, O.D., H.G.McDANIEL, J.A.PITTMAN.
"Standardization of TSH Testing"
J. Clin. Endocrinol.25 (1965) 266-277.

80. HAYS, M.T., D.H.SOLOMON, G.N.BEALL.
"Suppression of Human Thyroid Function by Antibodies to Bovine Thyrotropin", J. Clin. Endocrinol. 27 (1967) 1540-1549.

81. LEEPER, R.D.
"The Effect of ^{131}J-Therapy on Survival of Patients with Metastatic Papillary or Follicular Thyroid Carcinoma"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 (1973) 1143-1152.

82. WENZEL, K.W., H.MEINHOLD, U.BOGNER, F.ADLKOFER, H.SCHLEUSENER.
"Serum TSH Levels in Thyroidectomized Patients after Withdrawal of Thyroid Hormone Therapy or oral Administration of TRH"
Acta Endocrinol. (Kb'h), Suppl. 173 (1973), 15.

83. HERSHMAN, J.M., C.L.EDWARDS.
"Serum Thyrotropin (TSH) Levels after Thyroid Ablation compared with TSH Levels after Exogenous Bovine TSH: Implication for ^{131}J Treatment of Thyroid Carcinoma"
J. Clin. Endocrinol. 34 (1972) 814-818.

84. COTTON, G.E., G.C.GORMAN, W.E.MAYBERRY.
"Suppression of Thyrotropin (h-TSH) in Serum of Patients with Myxedema of Varying Etiology Treated with Thyroid Hormone"
N. Engl. J. Med. 285 (1971) 529-533.

Herrn Prof.Dr.K.Oeff danke ich für die Ermöglichung der Doktorarbeit. Herrn Dr.H.Meinhold und Herrn Dr.K.-W.Wenzel möchte ich für die wertvollen Ratschläge und Diskussionen meinen besten Dank sagen.

Weiterhin bedanke ich mich im Labor bei allen denjenigen, die mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützten.

Lebenslauf

Am 29. März 1949 Geburt als Sohn des Arztes Dr. Hugo Bogner und seiner Ehefrau Friedel, geb. Schroeter, in Salzgitter-Lebenstedt.
Von 1955 - 1959 Besuch der Volksschule in Salzgitter-Lebenstedt, von 1959 - 1967 Besuch und Erlangung des Reifezeugnisses am dortigen Gymnasium.
Ab Wintersemester 1967/68 Aufnahme des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin. Ablegung des Vorphysikums im Sommersemester 1968 und des Physikums im Wintersemester 1969/70. Fortsetzung des Medizinstudiums im Wintersemester 1970/71 an der Universität Wien und im Sommersemester 1971 an der Universität Heidelberg. Zum Wintersemester 1971/72 Rückkehr an die F.U. Berlin und Absolvierung des Staatsexamens im Sommersemester 1973.
Ab 1.12.1973 Aufnahme der Medizinalassistententätigkeit auf der Internen Abteilung des Klinikum Steglitz der Medizinischen Universitätskliniken der F.U. Berlin.